

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EFFECTOS DEL FULERENO C<sub>60</sub> Y COBRE  
MEDIADOS POR LUZ UV-VIS EN *Daphnia magna*  
EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en Hidrobiología  
y Pesquería**

**AUTOR**

**Diana Emperatriz Vásquez Aquino**

**Lima – Perú**

**2014**



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EFFECTOS DEL FULERENO C<sub>60</sub> Y COBRE MEDIADOS POR  
LUZ UV-VIS EN *Daphnia magna* EN CONDICIONES DE  
LABORATORIO**

Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en  
Hidrobiología y Pesquería

**Bachiller Diana Emperatriz Vásquez Aquino**

***Asesor: Dra. Egma Mayta Huatuco***

Lima - Perú

2014

A Dios y a María  
A mi familia  
A mi grupo Ven y Sígueme

## **AGRADECIMIENTOS**

Un agradecimiento muy especial a la Doctora Rafaela Elías-Letts, jefa del Laboratorio de Ecotoxicología Acuática - Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID) de la Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri” - Universidad Peruana Cayetano Heredia, cuya tolerancia, paciencia, orientación y apoyo incondicional, hicieron posible el desarrollo y ejecución de esta tesis.

A Raúl, Karem, Carla, Diego, Jenny y todos los demás miembros que conforman el Laboratorio de Ecotoxicología Acuática en la Universidad Cayetano Heredia por el apoyo y la compañía durante el desarrollo de este trabajo, con los cuales compartí pequeños grandes momentos.

A los jefes de las distintas unidades de investigación de Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri” por la gentileza del uso de equipos en sus ambientes para la medición de distintos parámetros propios de la presente investigación.

A la profesora Egma Mayta, cuya brillante asesoría hizo posible la culminación de este trabajo; y a los miembros del jurado: Blga. Silvia Aguilar, Mg. Liliana Tapia y Mg. Guillermo Álvarez por las sugerencias hechas para mejorar el contenido del presente trabajo.

A mis amigos Roxana, Nelly, Antonio, Marco, Vanessa, Elsa, Irene y Cinthia cuya amistad y confianza fue siempre un estímulo para la culminación de este trabajo.

Finalmente, mi agradecimiento hacia todas las personas con las que compartí este tiempo.

“Hemos sido creados libres, a imagen de Dios, precisamente para que seamos protagonistas de la búsqueda de la verdad y del bien, responsables de nuestras acciones, y no meros ejecutores ciegos, colaboradores creativos en la tarea de cultivar y embellecer la obra de la creación. Dios quiere un interlocutor responsable, alguien que pueda dialogar con Él y amarle. Por Cristo lo podemos conseguir verdaderamente y, arraigados en Él, damos alas a nuestra libertad.”

*Papa Benedicto XVI*

# TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	i
LISTA DE ILUSTRACIONES.....	ii
LISTA DE GRÁFICOS.....	iii
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>7</b>
2.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS .....	7
2.2 FULERENO COMO CONTAMINANTE .....	9
2.3 COBRE COMO CONTAMINANTE.....	14
2.4 INFLUENCIA DE LUZ UV SOBRE ECOSISTEMAS ACUÁTICOS.....	17
2.5 DAPHNIA COMO ORGANISMO ECOLÓGICAMENTE RELEVANTE Y COMO MODELO DE ESTUDIO .....	20
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	23
4.2 METODOLOGÍA .....	24
4.2.1 CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE <i>Daphnia magna</i> .....	26
4.2.2 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE FULERENO C <sub>60</sub> .....	26

4.2.3	DETERMINACIÓN DE EC <sub>50</sub> Y DL <sub>50</sub> PARA COBRE Y FULERENO C <sub>60</sub> .....	28
4.2.4	DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE MEZCLA DE FULERENO (C <sub>60</sub> ) Y COBRE (Cu) .....	30
4.2.5	ENSAYOS DE PRE Y POST IRRADIACIÓN CON UV-VIS .....	31
4.2.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	31
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
5.1	PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE FULERENO .....	32
5.2	DETERMINACIÓN DE EC <sub>50</sub> Y DL <sub>50</sub> PARA COBRE Y FULERENO C <sub>60</sub> .....	33
5.2.1	EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE SALTOS Y MORTALIDAD.....	33
5.2.2	MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE CON EL MÉTODO DEL DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRIL HIDRAZIL) .....	34
5.2.3	MEDICIÓN DE MELANINAS.....	36
5.3	DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE MEZCLA DE FULERENO (C <sub>60</sub> ) Y COBRE (Cu).....	38
5.4	ENSAYOS DE PRE Y POST IRRADIACIÓN CON UV-VIS.....	40
5.4.1	PRE IRRADIACIÓN A LUZ UV-VIS.....	40
5.4.2	POST IRRADIACIÓN A LUZ UV-VIS .....	45
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
6.1	COMPORTAMIENTO DE <i>Daphnia magna</i> ANTE LA EXPOSICIÓN DE FULERENO C <sub>60</sub> .....	53
6.2	EL DL <sub>50</sub> Y EC <sub>50</sub> COMO CRITERIOS ECOTOXICOLÓGICOS EN <i>Daphnia magna</i> .....	55
6.3	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL COMO MEDIDA INDIRECTA DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	56

6.4	PRODUCCIÓN DE MELANINAS COMO RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN DE FULERENO C <sub>60</sub> Y COBRE A DIFERENTES CONCENTRACIONES BAJO LA INFLUENCIA DE LUZ UV-VIS.....	58
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>VIII.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>IX.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>76</b>
	ANEXO N° 1: GALERÍA FOTOGRÁFICA.....	76



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla Nº 1:</b> Producción mundial estimada para la ingeniería de los nanomateriales.....	10
<b>Tabla Nº 2:</b> Efectos de los nanomateriales en <i>Daphnia magna</i> .....	12
<b>Tabla Nº 3:</b> Efectos del Cobre en <i>Daphnia magna</i> .....	15
<b>Tabla Nº 4:</b> Concentraciones de cobre y Fullereno C <sub>60</sub> en la determinación de la DL <sub>50</sub> y EC <sub>50</sub> .....	28
<b>Tabla Nº 5:</b> Dosis usadas para ensayo de mezcla de metales.....	30

## LISTA DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración N° 1:</b> <i>Daphnia magna</i> .....	23
<b>Ilustración N° 2:</b> Nanopartículas obtenidas después de agitar el Fulereo ( $C_{60}$ ) en agua Milli Q durante dos meses.....	32
<b>Ilustración N° 3:</b> Partes de <i>Daphnia magna</i> .....	76
<b>Ilustración N° 4:</b> Presencia de cúmulos de Fulereo $C_{60}$ en <i>Daphnia magna</i> .....	77
<b>Ilustración N° 5:</b> Prueba de Elisa para determinar Capacidad Antioxidante del Fulereo $C_{60}$ en <i>Daphnia magna</i> .....	78

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico Nº 1:</b> Frecuencia de saltos de <i>Daphnia magna</i> después de la exposición al Cobre (a). Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ).....	33
<b>Gráfico Nº 2:</b> Frecuencia de saltos de <i>Daphnia magna</i> después de la exposición al Fullereno. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ).....	34
<b>Gráfico Nº 3:</b> Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de <i>Daphnia magna</i> después de la exposición a Cobre. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ).....	35
<b>Gráfico Nº 4:</b> Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de <i>Daphnia magna</i> después de la exposición a Fullereno ( $C_{60}$ ). Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ).....	36
<b>Gráfico Nº 5:</b> Cantidad total de Melaninas (ug/mg peso seco) en <i>Daphnia magna</i> después de la exposición a Cobre (Cu). Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ).....	37
<b>Gráfico Nº 6:</b> Cantidad total de Melaninas (ug/mg peso seco) en <i>Daphnia magna</i> después de la exposición a Fullereno ( $C_{60}$ ). Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ).....	37
<b>Gráfico Nº 7:</b> Frecuencia de saltos de <i>Daphnia magna</i> después de la exposición a la mezcla de Fullereno y Cobre. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ).....	38
<b>Gráfico Nº 8:</b> Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de <i>Daphnia magna</i> después de la exposición a la mezcla de Fullereno ( $C_{60}$ ) y Cobre. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ).....	39
<b>Gráfico Nº 9:</b> Cantidad total de Melaninas (ug/mg peso seco) en <i>Daphnia magna</i> después de la exposición a la mezcla de Fullereno ( $C_{60}$ ) y Cobre. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ).....	40
<b>Gráfico Nº 10:</b> Frecuencia de saltos de <i>Daphnia magna</i> después de la exposición a Fullereno ( $C_{60}$ ) pre-irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ).....	41
<b>Gráfico Nº 11:</b> Frecuencia de saltos de <i>Daphnia magna</i> después de la exposición a la mezcla de Fullereno ( $C_{60}$ ) y Cobre pre-irradiado con luz UV-Vis. Los datos están	

expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ). .....41

**Gráfico N° 12:** Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de *Daphnia magna* después de la exposición a Fulereno ( $C_{60}$ ) pre-irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras similares indican ausencia de diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ). .....42

**Gráfico N° 13:** Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de *Daphnia magna* después de la exposición a la mezcla de Fulereno ( $C_{60}$ ) y Cobre pre-irradiados con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras similares indican ausencia de diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ). .....43

**Gráfico N° 14:** Cantidad total de Melaninas (ug/mg peso seco) en *Daphnia magna* después de la exposición a Fulereno ( $C_{60}$ ) previamente irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ). .....44

**Gráfico N° 15:** Cantidad total de Melaninas (ug/mg peso seco) en *Daphnia magna* después de la exposición a la mezcla de Fulereno ( $C_{60}$ ) y Cobre previamente irradiado. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ). .....44

**Gráfico N° 16:** Frecuencia de saltos de *Daphnia magna* después de la exposición a Fulereno ( $C_{60}$ ) post-irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ). .....45

**Gráfico N° 17:** Frecuencia de saltos de *Daphnia magna* después de la exposición a la mezcla de Fulereno ( $C_{60}$ ) y Cobre post-irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras similares indican ausencia de diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ). .....46

**Gráfico N° 18:** Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de *Daphnia magna* después de la exposición a Fulereno ( $C_{60}$ ) post-irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras similares indican ausencia de diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ). .....47

**Gráfico N° 19:** Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de *Daphnia magna* después de la exposición a la mezcla de Fulereno ( $C_{60}$ ) y Cobre post-irradiados con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras similares indican ausencia de diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ). .....47

**Gráfico N° 20:** Cantidad total de Melaninas (ug/mg peso seco) en *Daphnia magna* después de la exposición a Fulereno ( $C_{60}$ ) post-irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ). .....48

**Gráfico N° 21:** Cantidad total de Melaninas (ug/mg peso seco) en *Daphnia magna* después de la exposición a la mezcla de Fulereno ( $C_{60}$ ) y Cobre previamente irradiado. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ). .....49

<b>Gráfico N° 22:</b> Número de Saltos de <i>Daphnia magna</i> después de todos los tratamientos ensayados de pre y post radiación UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ). .....	49
<b>Gráfico N° 23:</b> Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de <i>Daphnia magna</i> después de todos los tratamientos ensayados de pre y post radiación UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras similares indican ausencia de diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ). .....	51
<b>Gráfico N° 24:</b> Cantidad de Melaninas producidas en <i>Daphnia magna</i> después de todos los tratamientos ensayados de pre y post radiación UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ). .....	52

## RESUMEN

En los últimos años ha surgido una nueva tecnología en el rango nanométrico denominado hoy en día Nanotecnología. Desde su descubrimiento, la producción y uso de nanomateriales se ha visto incrementado rápidamente. Uno de ellos es el Fullereno ( $C_{60}$ ), el cual es utilizado en diferentes campos de la ciencia y la tecnología como la medicina, cosmética, electricidad, entre otros. Esta nueva industria genera desechos de producción que tienen como destino final los ambientes acuáticos, del mismo modo los residuos del uso de productos que contienen nanomateriales como los son algunos detergentes, bloqueadores solares, desodorantes. Como es sabido los ambientes acuáticos son dinámicos y conformados por múltiples componentes. Sin embargo, no se han realizado suficientes evaluaciones de los posibles efectos de la exposición de dicho compuesto en el ambiente y por ende, en los organismos, más aún, la interacción del mismo con otros contaminantes de origen natural o artificial.

El presente estudio fue realizado con el fin de evaluar la influencia de un nanocompuesto denominado Fullereno ( $C_{60}$ ) sobre un organismo acuático denominado *Daphnia magna*, mediado por dos factores adicionales: un metal (Cobre) y la luz ultravioleta en condiciones de laboratorio. Para ello, se obtuvieron “dafnias” que posteriormente fueron reproducidas considerando 16h luz/ 8h oscuridad y una alimentación en base a Nutrafiin basic® (3g) suplementado con levadura (0.05g).

Luego del cultivo, se sometió a los organismos juveniles de *Daphnia magna*, a diferentes tratamientos durante 48 hrs., luego de los cuales se evaluó lo siguiente: 1)  $DL_{50}$  y la  $EC_{50}$  en diferentes concentraciones de Fullereno ( $C_{60}$ ) y Cobre; 2) El grado de estrés oxidativo generado por una gradiente de concentraciones de Fullereno ( $C_{60}$ ) y Cobre; 3) Evaluar su comportamiento considerando la frecuencia de saltos por minuto

ante la exposición a diferentes concentraciones y bajo la influencia de luz UV (pre y post); y, 4) Evaluar la producción de melaninas como respuesta a la exposición de Fulereo  $C_{60}$  y Cobre a diferentes concentraciones y bajo la influencia de luz UV (pre y post). Esto permitió estimar el riesgo ambiental del fulereo aunado a contaminantes clásicos como un metal (Cobre) y la luz UV, a fin de proponer posibles mecanismos de acción.

Los resultados muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto a capacidad antioxidante entre un pre y post tratamiento con luz UV-Vis, sin embargo sí existen diferencias a nivel comportamental (frecuencia de saltos) y entre la cantidad de melaninas generadas entre ambos tratamientos considerando la mezcla de Fulereo  $C_{60}$  y Cobre, y la pre y post exposición a radiación UV.

**Palabras clave:** Fulereo ( $C_{60}$ ), Cobre, Capacidad antioxidante, Frecuencia de saltos, Melanina.

## ABSTRACT

In recent years there has emerged a new technology in the nanometer range today called Nanotechnology . Since its discovery , production and use of nanomaterials has been increased rapidly . One is the Fullerene (C<sub>60</sub> ) , which is used in different fields of science and technology such as medicine , cosmetics , electricity , among others. This new industry generates waste production are destined for aquatic environments , just as the use of waste products containing nanomaterials as are some detergents , sunscreens , deodorants . As is well known aquatic environments are dynamic and shaped by multiple components. However, there have been sufficient assessments of the potential effects of exposure to this compound in the environment and therefore, in organisms, even more , its interaction with other pollutants of natural or artificial origin.

This study was conducted in order to evaluate the influence of a nanocomposite called Fullerene (C<sub>60</sub>) on a water body called *Daphnia magna*, mediated by two other factors: a metal (copper) and the ultraviolet light in the laboratory. To do this, “daphnia” which were subsequently reproduced considering 16h light / 8h dark and feeding based on basic Nutrafiin® (3g) supplemented with yeast (0.05g) was obtained.

After the culture was subjected to youth organizations *Daphnia magna*, to different treatments for 48 h, after which the following were evaluated: 1) LD<sub>50</sub> and EC<sub>50</sub> in different concentrations of Fullerene (C<sub>60</sub>) and Copper; 2) The degree of oxidative stress generated by a concentration gradient of fullerene (C<sub>60</sub>) and Copper; 3) Assess their behavior considering the frequency of jumps per minute when exposed to different concentrations and under the influence of UV light (pre and post); and 4) Evaluate the production of melanin in response to exposure of fullerene C<sub>60</sub> and copper at different concentrations and under the influence of UV light (pre and post) . This allowed us to



estimate the environmental risk of fullerene contaminants coupled with classics like a metal (copper) and UV light in order to propose possible mechanisms of action.

The results show no statistically significant differences in antioxidant capacity between before and after treatment with UV -Vis light, however there are differences at the behavioral level (frequency hopping) and between the amount of melanin generated between both treatments considering fullerene C<sub>60</sub> mixture and Copper, and pre and post exposure to UV radiation.

**Keywords:** Fullerene (C<sub>60</sub>), Copper, antioxidant capacity, frequency jumps, Melanin.

## I. INTRODUCCIÓN

La creciente producción de nanomateriales ha superado largamente el avance en los conocimientos sobre los efectos biológicos que pueden ocasionar estas partículas. Esta falta de información ha permitido el desarrollo de lo que hoy en día se conoce como Nanotoxicología, una disciplina orientada a evaluar el efecto de nanomateriales sobre organismos vivos (Dal Forno *et al.*, 2013). Para este proyecto, nos hemos centrado en el Fullereno ( $C_{60}$ ) debido a su creciente producción y uso (Avanasi, 2014) y es probable que con el tiempo se encuentre en el ambiente en concentraciones que superen la capacidad de asimilación y regeneración de la naturaleza. En el agua, las moléculas de Fullereno ( $C_{60}$ ) forman coloides, algunos de los cuales están dentro de la escala nanométrica (Lyon *et al.*, 2006). Estas asociaciones confieren al Fullereno una alta relación superficie/volumen y en relación con otros compuestos ofrecen una alta reactividad biológica. Considerando dicha reactividad, los Fullerenos pueden tornarse potencialmente tóxicos si se toma en cuenta que son materiales lipofílicos que tienden a ser almacenados por los organismos en zonas de tejidos grasos. Su naturaleza no polar le permite pasar a través de membranas biológicas, considerándose por ello, una herramienta importante como conductor farmacológico (Montellano *et al.*, 2011). Sin embargo estas características físico químicas pueden llevar a un potencial riesgo desde el punto de vista ecotoxicológico, siendo esta nanopartícula una potencial generadora de estrés, generando riesgos innecesarios en el ambiente (Gottschalk *et al.*, 2013).

Se sabe que los fullerenos son utilizados como ingredientes en productos de cuidado personal, tales como filtros solares (Wissing SA, 2001). Cabe destacar que las formas activas de algunos de estos ingredientes usados en los filtros solares y productos para el cuidado personal han sido encontrados en niveles mensurables en los lagos de

Europa y en otros lugares, en donde los niveles de impactos sobre la fauna se están evaluando (Daughton CG, 1999).

Además, se han reportado diferentes respuestas de toxicidad al Fullereno por parte de bacterias, crustáceos y peces (Fortner *et al.*, 2005; Lovern y Klaper, 2006; Oberdöster *et al.*, 2006). En el caso de crustáceos se trabajó con LC<sub>50</sub> de 0.8 mg/L en *Daphnia magna* expuesta durante 48 horas a C<sub>60</sub> disuelto inicialmente en Tetrahidrofurano (Zhu *et al.*, 2006).

En peces, Eva Oberdoster (2004) ha corroborado que los Fullerenos como el C<sub>60</sub> pueden inducir un estrés oxidante en los cerebros de los peces róbalo; mientras que peces lubina sufrieron daño celular en el tejido cerebral 17 veces superior, 48 horas después de someterlos a concentraciones de 0,5 partes por millón, producto de un estrés oxidativo. El daño consistía en una peroxidación lipídica a nivel de la membrana celular, lo que deteriora el funcionamiento. Se produjeron también inflamaciones en el hígado y la activación de genes relacionados con la síntesis de enzimas reparadoras. Por otro lado, el grupo de Lonné *et al* en el 2008, sometió a hepatocitos de Pez Cebra (*Danio rerio*) a la coexposición de Benzo[A]Pireno y Fullereno C<sub>60</sub>, donde encontraron alteraciones en su funcionalidad mitocondrial.

Más aun, Lovern y Klaper (2006) sugieren un considerable grado de mortalidad de *Daphnia magna* (un diminuto crustáceo, popular alimento para peces de acuario, y usualmente utilizado por su sensibilidad en estudios ecotoxicológicos) cuando son expuestos a nanopartículas de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) y al Fullereno C<sub>60</sub>.

Sin embargo, en el 2011, un grupo de investigadores dirigidos por Henry T. presentaron un reporte sobre los estudios realizados con Fullereno (C<sub>60</sub>) anteriormente, concluyendo que tenía que revisarse la metodología usada, sobretudo el uso de

solventes (en particular el Tetrahidrofurano) para preparar soluciones adecuadas para las pruebas ecotoxicológicas de C<sub>60</sub>. Esto debido a que dichos solventes podrían haber quedado atrapados dentro de la estructura del Fulereo C<sub>60</sub> o en aglomeraciones de Fulerenos y haber sido los verdaderos causantes de la toxicidad encontrada en los organismos usados. Producto de esta hipótesis, el residuo de Tetrahidrofurano ha sido propuesto como una causa probable de la toxicidad observada (Gharbi *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2007) y se han encontrado altos valores de LC<sub>50</sub> en estudios donde el Tetrahidrofurano no ha sido aplicado (Oberdöster *et al.*, 2006). El estudio de Henry *et al* (2011) además afirmó que el C<sub>60</sub> y sus derivados tienen un potencial mínimo para producir Especies Reactivas de Oxígeno, y que por tanto, el Fulereo presentaba una baja toxicidad; aunque eso no incluía la premisa de que debido a sus características, este nanocompuesto podría estar involucrado en el destino, transporte, biodisponibilidad y bioacumulación de otros cocontaminantes en los organismos acuáticos. Por ello, en este estudio se ha utilizado una solución acuosa coloidal del Fulereo C<sub>60</sub>, y así evitar que los resultados estén influenciados por otro tipo de solventes normalmente utilizados (Andrievsky, G. *et al.*, 2002).

De acuerdo a lo mencionado en el párrafo anterior, se va a evaluar el rol del Fulereo con otros contaminantes como los metales pesados, los cuales se destacan por su toxicidad sobre los organismos en los ecosistemas acuáticos y originan estrés oxidativo (Sengupta *et al*, 2013). Su efecto se relaciona con una alteración de la homeostasis de cationes como Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup>, afectando el transporte a nivel de membrana celular (Pane *et al.*, 2003). También afectan los mecanismos de respiración disminuyendo la tasa de respiración. En este proyecto se tomó como metal al Cobre debido a su presencia en concentraciones muy bajas (0.01 – 0.04 mg/L) en los ecosistemas acuáticos, pudiendo causar toxicidad en los organismos acuáticos más sensibles. Según investigaciones con el anfibio *Rhinella arenarum*, esta es resistente a la exposición inicial con Cobre, pero su sensibilidad va aumentando con el tiempo de

exposición (Pérez-Coll, C – 2008). En otros estudios, se ha visto al Cobre como un metal que causa daños a nivel lipídico (aumento en la peroxidación lipídica) y en la respuesta enzimática antioxidante, cuando su exposición es prolongada en la almeja de agua dulce *Diplodon chilensis*, la cual tiende a almacenar el metal en el hepatopáncreas. (Ríos de Molina, M. C. – 2008). Para el caso del organismo que se utilizará en este experimento, Díaz – Báez M. C. *et al* (2008) realizó una evaluación de la toxicidad de mezclas binarias equitóxicas de Cu, Cr, Ni y Zn en el crustáceo *Daphnia magna*, donde el Cobre mostró la mayor toxicidad cuando es empleado de manera unitaria, mientras que cuando es combinado con otros metales, su efecto es aditivo o antagónico. En el caso de que ocurra el contacto con los fulerenos C<sub>60</sub>, y por las propiedades de ellos, estos pueden funcionar como vehículo para atravesar las membranas celulares de los organismos. Limbach *et al.* 2007 describió la capacidad que poseen la nanopartículas para unirse a metales, permitiendo una entrada al epitelio pulmonar aumentando de esa manera, la tasa de entrada de metales y generando un aumento de hasta en ocho veces los niveles de EAOs (Especies Activas de Oxígeno), que incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos.

Oberdörster *et al.*, (2006) y Lovern *et al.* (2007) reportaron efectos del Fulereno a nivel de poblaciones y parámetros reproductivos en *Daphnia magna* así como sobre diversos parámetros fisiológicos y de comportamiento, incluyendo frecuencia de saltos, movimiento de los apéndices filtradores y frecuencia cardíaca encontrando una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia cardíaca, en comparación con otros compuestos analizados como dióxido de titanio e indujeron efectos asociados con el incremento del riesgo por depredación y disminución de la tasa reproductiva.

Variables ambientales de relevancia como la radiación UV han mostrado un aumento en la toxicidad del Fulereno. Se sabe que hay dos maneras de modificar los fulerenos

para que sean más biocompatibles y menos tóxicos mediante el uso de diferentes recubrimientos y de modificaciones covalentes de superficie. Aunque este es un ejercicio valioso en el laboratorio, algunos estudios han demostrado que estos recubrimientos y modificaciones covalentes de superficie puede alterarse bajo exposición a rayos UV-Vis o exposición al oxígeno en el aire, y causar una rápida citotoxicidad (Derfus A *et al.*, 2004; Rancan F. *et al.*, 2002). Por lo tanto, aunque los recubrimientos y modificaciones de superficies pueden ser de importancia crítica en dispositivos de liberación de fármacos, la probabilidad de desgaste bajo condiciones ambientales hace que sea importante para estudiar la toxicidad bajo UV y las condiciones del aire de exposición. Por otro lado, Kamat *et al.* (1998) observó que el Fullereno poseía la habilidad de inducir estrés oxidativo en microsomas de rata después de ser irradiado con UV, un efecto asociado a la generación de oxígeno singlete (un átomo de oxígeno en un estado excitado), al que se le atribuyen los efectos dañinos de la luz solar sobre muchos materiales orgánicos (polímeros, etc.). Posteriores estudios dentro del mismo grupo (Kamat *et al.*, 2000) reportaron que el Fullereno y sus derivados solubles en agua pueden generar especies reactivas de oxígeno después de una fotosensibilización con UV o luz visible. Nosotros evaluamos esta activación de Fullereno por UV en relación con su capacidad de asociarse a un contaminante persistente como el cobre, encontrando un aumento de la toxicidad del Fullereno bajo la influencia de luz UV y asociado a cobre y una correspondencia con generación de estrés oxidativo en individuos de *Daphnia magna*.

Para la realización de este trabajo se ha puesto especial interés en trabajar con *Daphnia magna*, un organismo presente en cuerpos de agua dulce y que constituye un importante modelo para estudios toxicológicos. Dentro del desarrollo de los ensayos con este organismo, se desea evaluar el efecto del Fullereno C<sub>60</sub> interactuando con Cobre y mediados por la radiación UV-Vis sobre este organismo en condiciones de

laboratorio, dado que es una especie típica de humedales y sensible a variaciones ambientales y contaminación.

El problema presente en esta tesis, plantea en qué medida el Fullerenos  $C_{60}$  solo o en interacción con otros factores como Cu y Luz UV-Vis, afectan la condición de *Daphnia magna*. La *hipótesis alterna* plantea que la exposición de *Daphnia magna* a fullereno individualmente o en interacción con otros componentes como Cobre y luz UV generará algún tipo de efecto a nivel fisiológico o comportamental. Mientras que la *hipótesis nula* plantea que la exposición de *Daphnia magna* a fullereno individualmente o en interacción con otros componentes como Cobre y luz UV no generará algún tipo de efecto a nivel fisiológico o comportamental.

## **II. ANTECEDENTES. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS**

En nuestro planeta, el 70% de la superficie terrestre está cubierta por agua, siendo el 97% de aguas oceánicas y mares, mientras que el 3% restante pertenece a las aguas continentales, como ríos, lagos, aguas subterráneas y glaciares. Estos cuerpos de agua sostienen a los ecosistemas acuáticos, los cuales, producen más del 50% de la biomasa de la Tierra (Zepp *et al.*, 2007). Las condiciones químicas y física del agua son las que determinan mayormente el crecimiento de organismos y especies en determinado cuerpo de agua. Los productores primarios de los ecosistemas acuáticos continentales y marinos constituyen la base de las complejas redes tróficas, proporcionando energía a los consumidores primarios y secundarios, además de ser importantes contribuyentes en la producción de la dieta humana básica bajo la forma de crustáceos, peces y mamíferos (Häder, 2003; Sinha *et al.*, 2002).

Sin embargo, debido a los constantes y drásticos cambios que está sufriendo nuestro planeta por factores antrópicos, principalmente por el crecimiento desmedido de las industrias y explotación de recursos, se están haciendo cada vez más latentes las alteraciones sobre los ecosistemas. Esto muestra que la trayectoria que ha seguido el desarrollo económico ha causado daños, en algunos casos irreparables, en la mayor parte de los ecosistemas, sobre todo en los acuáticos.

Dentro de estos cambios drásticos, cabe destacar los claros indicios de reducción en la disponibilidad de agua tanto en cantidad como en calidad debido a los efectos cada vez más nocivos de los desechos domésticos e industriales vertidos en cantidades que sobrepasan la de los ecosistemas para poder degradarlos; y que por tanto se tiene



que recurrir a nuevos métodos de tratamiento a nivel antrópico (Clemente *et al.*, 2013). A esto, es importante agregar que a semejanza de los ecosistemas terrestres, los ecosistemas acuáticos tienen propiedades de resistencia al cambio y un cierto grado de resiliencia que tiende a volverlos al estado original luego de experimentar cambios moderados. Sin embargo, una vez alterados más allá del límite del que pueden ser manejados por estas dos propiedades, los entornos acuáticos no regresarán necesariamente a su estado inicial debido a que su estabilidad temporal puede depender de un balance específico entre muchos factores que confluyen muy estrechamente en su existencia (Conde-Porcuna *et al.*, 2002).

Incluso, los cambios en los ecosistemas acuáticos pueden llegar a ser drásticos luego de periodos relativamente largos de aparente y engañosa resistencia a las alteraciones. De acuerdo a Hobbs y Norton (1996), los ecosistemas acuáticos están inmersos en estados sucesivos de estabilidad, la cual, en caso de deterioro de variables importantes, puede generarse una “caída” del ecosistema hacia algún otro estado, relativa y temporalmente estable pero quizá depauperado en riqueza de especies y de funciones ecosistémicas.

Tras exceder el límite para diluir y degradar contaminantes, todo ecosistema acuático empezará a deteriorarse, y no siempre con una tasa predecible, sino que debido a los efectos sinérgicos de varias alteraciones, eventualmente se precipitará su destrucción, luego de un periodo de aparente resistencia, hasta un deterioro irreversible.

Una de las industrias con creciente desarrollo es el de los nanocompuestos (Dal Forno *et al.*, 2013), siendo algunas de sus características su alta reactividad y un aumento de la misma en presencia de luz. Dichas características generan una condición particular ya que estos nanocompuestos pueden generar asociación con contaminantes clásicos

como el cobre (Tao *et al.*, 2013) generando moléculas con un poder tóxico que poco a poco se ha ido reportando.

## 2.2 FULERENO COMO CONTAMINANTE

De acuerdo con la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (National Nanotechnology Initiative, 2009), la Nanotecnología se define como la comprensión y el control de la materia en dimensiones entre aproximadamente 1 y 100 nanómetros. En este rango se encuentra la molécula del Fulereo la cual fue descubierta por Kroto *et al* en el año 1985. El Fulereo ( $C_{60}$ ) es una partícula hidrofóbica, con 60 carbonos, donde los anillos aromáticos que constituyen la estructura de esta molécula generan una conformación esférica. Sus 60 átomos de carbono unidos simulan una estructura de pelota de fútbol. Las nanopartículas  $C_{60}$  han recibido mucha atención los últimos años debido a sus propiedades únicas resultado de sus nanodimensiones en diferentes campos de la ciencia y la tecnología.

Se han propuesto numerosas aplicaciones potenciales para los Fulerenos a nivel de productos de consumo los cuales van desde lubricantes para autos hasta cosméticos (Franco *et al.*, 2007). Cabe citar la química de síntesis, como catalizadores, la fabricación de células solares, en fotodetectores de rayos X, en telecomunicaciones, como recolectores de radicales libres, en pilas de combustible, etc. (Prato, 1999; Bosi *et al.*, 2003). Dado que sus propiedades ópticas cambian mucho al exponerse a la luz, se propone también su uso en dispositivos fotónicos. En el campo de la medicina, se destacan sus propiedades como transportador de drogas, fotoclivaje de DNA, actividad antibacterial y antiviral, e inhibición enzimática (Da Ros, 2008). Se ha sugerido incluso su uso como inhibidor de la proteasa del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), cuyo sitio activo tiene forma cilíndrica con un diámetro similar al del Fulereo  $C_{60}$  y está recubierto casi exclusivamente por residuos aminoácidos hidrófobos, un entorno

favorable para la fijación del Fullereno, que bloquea así el centro activo e impide la propagación del virus (Wudl, 2002).

Debido a sus múltiples aplicaciones antropogénicas, la industria del Fullereno ha crecido exponencialmente los últimos años (Guzmán *et al.*, 2006). Incluso, su fabricación pronto podría coincidir con la ingeniería de nanopartículas de óxido de metal en cuanto a cantidades de producción se refiere, debido al funcionamiento de la planta de Kitakyushu (Mitsubishi, Japón) la cual tuvo una producción anual de 1500 toneladas de  $C_{60}$  en el 2007. Además, ese mismo año otras instalaciones de fabricación también previeron un aumento de la producción de Fullereno, y, por tanto, la suma de producción logró ser de varios miles de toneladas de Fullerenos en dicho año.

A continuación se puede observar las proyecciones en la fabricación de los diversos nanomateriales según algunos expertos:

**Tabla Nº 1:** Producción mundial estimada para la ingeniería de los nanomateriales

Aplicación	Nanomaterial/Dispositivo	Producción global estimada (ton/año)		
		2003/04	2010	2020
Aplicaciones estructurales	Cerámicas, catalizadores, películas y recubrimientos, composites, metales	10	$10^3$	$10^4 - 10^5$
Productos para el cuidado de la piel	Óxidos metálicos (eg. $TiO_2$ , ZnO)	$10^3$	$10^3$	$10^3$
Tecnologías de información y comunicación	SWNT (nanotubos de pared simple), materiales nanoelectrónicos y optoelectrónicos (excluyendo los compuestos acuosos CMP), emisores de luz orgánicos y electrónicos, nanofósforos	10	$10^2$	$>10^3$
Biotechnología	Nanocomposites & encapsulados, fármacos dirigidos, marcadores de diagnóstico, biosensores.	<1	1	10
Ambiente	Nanofiltración, membranas	10	$10^2$	$10^3 - 10^4$

Fuente: Borm *et al.*, 2006.

El incremento de la producción y uso de Fullerenos abre una brecha de interrogantes respecto a qué sucede cuando este componente se libera al ambiente principalmente a los cuerpos de agua, durante sus fases de fabricación, utilización e eliminación (Reijnders L., 2005). El comportamiento del Fullerenos en solución acuosa ha sido descrito a detalle por Fortner *et al* (2005) y Lee *et al* (2007); y ha sido objeto de debate en los últimos años y de conflictos inconclusos (Kepley, 2012). Debido a su extrema pequeñez, hidrofobicidad, la fuerte movilidad y alta lipofilicidad, el Fullerenos puede cruzar la membrana celular externa y puede localizarse en la mitocondria, citoplasma, lisosomas y núcleo celular (Foley *et al.*, 2002; Porter *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2013).

Esta propiedad de atravesar las membranas, ha permitido investigar sobre su posibilidad de actuar como transportador de drogas (Montellano *et al.*, 2011) con el propósito de llevar fármacos hacia órganos específicos y lograr atravesar la defensa de las células como la barrera hematoencefalica (Vogelson, 2001; Kreuter *et al*; Levi *et al.*, 2006). Esta potencial función vectorial del Fullerenos puede ser un factor significativo, cuando se considera los efectos ambientales de este, debido a la posible interacción con contaminantes xenobióticos presentes en el medio ambiente (Xing, 2013). En el siguiente cuadro se ve los efectos registrados de algunos nanomateriales cuando se realizaron pruebas en el cladócono *Daphnia magna*:

**Tabla Nº 2:** Efectos de los nanomateriales en *Daphnia magna*.

Nanomaterial	Valores	Parámetros	Referencias
Non-nanoscale ZnO	1.0 mg/L	Agudo EC <sub>50</sub>	Wiench (2009)
Z-COTE® (ZnO cubierto)	7.5 mg/L	Agudo EC <sub>50</sub>	Wiench, (2009)
Z-COTE® (ZnO cubierto)	1.0 mg/L	Agudo EC <sub>50</sub>	Wiench, (2009)
ZnO coloidal	10 ppm	LC <sub>50</sub> a las 48 horas	Jingyuan (2007)
TiO <sub>2</sub>	2 ppm	Nado esporádico y desorientación	Lovern and Klaper (2007)
TiO <sub>2</sub>	10 mg/L	Severo retardo en el crecimiento y mortalidad a los 21 días	Zhu (2010)
Fulerenos coloidales (nC <sub>60</sub> )	800 ppb	LC <sub>50</sub> a las 48-horas	Oberdörster (2004c)
Fulerenos coloidales (nC <sub>60</sub> )	10 ppm	LC <sub>50</sub> a las 48 horas	Jingyuan (2007)
Dióxido de Titanio (TiO <sub>2</sub> ) y Fulerenos C <sub>60</sub> descubiertos	5.5 ppm and 460 ppb	LC <sub>50</sub> a las 48-horas	Lovern y Klaper (2006)
Nanomaterial TiO <sub>2</sub> (T-Lite™)		Disminución de crecimiento y reproducción	Fougeray (2012)
DWCNT	22.75 ppm	LC <sub>50</sub> 48-hour	Cattaneo (2009)
SWCNT	2.42P ppm	LC <sub>50</sub> 48-hour	Cattaneo (2009)
C <sub>60</sub>	20 lg/ml	Disminución de la replicación del DNA	Liang (2009)
Nanopartícula TiO <sub>2</sub>	5 mg/L	Generación de ROS	Kim (2010)
C70-Ácido gálico	0.1 mg/L	Incremento de SOD y actividad GPX	Seda (2012)
C70- Ácido gálico	0.03 mg/LC70	Fragmentación del DNA	Seda (2012)

Los ambientes acuáticos pueden ser vulnerables debido a la posibilidad de mezcla rápida y dispersión de los nanomateriales que entran en el sistema como los efluentes de aguas residuales de la industria o domésticos, así como la escorrentía del agua de

lluvia. Se conoce poco acerca de la influencia de estas nanopartículas en los organismos acuáticos o cómo predecir sus posibles impactos.

Sin embargo, una de sus implicancias en el medio acuático, tiene que ver con los organismos filtroalimentadores los cuales representan un grupo objetivo de estas nanopartículas debido a su tamaño y su papel como los primeros consumidores en la red trófica. En el ecosistema acuático, el zooplancton y los invertebrados filtradores constituyen la base de las redes tróficas. Los organismos zooplanctónicos como los rotíferos y braquiópodos, son tan pequeños que se alimentan de componentes de tamaño nanométrico, entre ellos bacterias, virus y macromoléculas orgánicas. Es decir que, cualquier componente de dicho tamaño puede ser consumido por el zooplancton. Con lo cual, se origina el riesgo de que dichos organismos filtren compuestos como en Fulereo, desconociéndose los efectos que esto puede causar.

Si la ingeniería de nanomateriales, llega a utilizar ampliamente compuestos como el Fulereo en los productos para el cuidado personal, sin duda dichos compuestos entrarán en contacto directo con el medio ambiente (Roco, 2005; Helland *et al.*, 2006; Siegrist *et al.*, 2007). Por ello, se debe evaluar los riesgos relacionados con la transferencia de este nanocompuesto y persistencia en el medio ambiente (Biswas *et al.*, 2005; Wiesner *et al.*, 2006, Helland *et al* 2008).

En el presente estudio se busca evaluar los efectos del Fulereo en el medio acuático cuando este es vertido a los cuerpos acuáticos y entra en contacto con los organismos que forman parte de la base de las cadenas tróficas, como los son los invertebrados que se alimentan por filtración. Además de su interacción con otros contaminantes comunes.

## 2.3 COBRE COMO CONTAMINANTE

Por las actividades que se desarrollan hoy en día por parte de las industrias, los ecosistemas acuáticos pueden sufrir perturbaciones de diversa índole originada básicamente por los desechos que originan dichas industriales y las cuales son vertidas a los cuerpos de agua. Este tipo de perturbaciones pueden llegar hasta niveles químicos, modificando las condiciones naturales del ambiente acuático (Baudo 1987; Kerrison *et al* 1988; Evans & McNaught 1988; Keller & Yan 1991; Mandal *et al.*, 2014). Una perturbación química de origen antrópico frecuente en ecosistemas acuáticos continentales es el incremento de metales pesados en solución. En la literatura abundan los trabajos de tipo toxicológico que vinculan la concentración de metales pesados u otras sustancias potencialmente tóxicas con la mortalidad de distintas especies de organismos, sobre todo los invertebrados, los cuales forman parte de niveles basales de las cadenas tróficas. Algunos autores mencionan el efecto negativo de metales como el plomo, mercurio, zinc, cadmio, molibdeno y cobre sobre distintas especies zooplanctónicas (Evans & McNaught 1988; Keller & Yan 1991; Correa & Ojeda 1997). Además, es sabido que metales tales como hierro, cobre, cromo, vanadio y cobalto son capaces de hacer ciclos redox en los que un solo electrón puede ser aceptado o donado por el metal. Esta acción cataliza reacciones que producen radicales y puede producir Especies Reactivas de Oxígeno, las cuales pueden perjudicar a los organismos.

El cobre es uno de los elementos traza más importantes para las plantas y animales. Sin embargo, si las plantas y animales son expuestas a concentraciones elevadas de cobre biodisponible, puede ocurrir bioacumulación, con efectos tóxicos (Mandal *et al.*, 2014; Jorge *et al.*, 2013). Y el cobre es un metal pesado considerado altamente tóxico (APHA 1971; Cairns & Dickson 1978) en su forma iónica a concentraciones mayores a

5 mg l-1, concentración que Fleming & Trevors (1989) indican como propia de la mayoría de los cuerpos de agua continentales.

En la siguiente tabla se aprecia algunos efectos producidos por el contacto con el cobre en *Daphnia magna*:

**Tabla Nº 3:** Efectos del Cobre en *Daphnia magna*

Elemento o compuesto	Valores	Efectos	Referencias
<b>Cu.SO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 99%</b>	15.8µg/L	Toxicidad aguda LC <sub>50</sub> a las 24-horas	<b>Gaste, 2007</b>
<b>Cu</b>	600mmol/L	LC <sub>50</sub> a las 48-horas	<b>Barata, 2006</b>
<b>Cu</b>	41-36 µg/L	EC <sub>50</sub> a los 21 días, reducción en la capacidad reproductiva	<b>De Schamphelaere, 2004</b>
<b>Cl<sub>2</sub>Cu</b>	60µg/L	LC <sub>50</sub> a las 24-horas	<b>Gaete, 1996</b>
<b>Cu</b>	0.1 – 0.18 mg/L	Hiperactividad e incremento en la actividad locomotora (24-horas) y disminución en el nado hasta la muerte (48-horas)	<b>Khangarot, 2003</b>
<b>Placusan (40.7% Sulfato cuprocálcico y 17.9% Oxidocloruro de Cobre)</b>	0.29 mg/L	EC <sub>50</sub> a las 48-horas. Muy tóxico para organismo acuáticos, evitar contaminación de aguas.	<b>EPA, 2007</b>
<b>Cu.SO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	0.024 mg/L	EC <sub>50</sub> a las 24-horas. Muy tóxico para <i>D. magna</i> .	<b>Agencia Europea para Sustancias y Preparados Químicos, 2011</b>
<b>Cu<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>10.5</sub>S</b>	2.3 mg/L	EC <sub>50</sub> a las 24-horas	<b>Kerle, 1996</b>
<b>Cu<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>10.5</sub>S</b>	0.057 mg/L	EC <sub>50</sub> a las 21-días	<b>Kerle, 1996</b>
<b>Cu</b>	1.4-70µg/L	Toxicidad aguda	<b>Bossuyt, 2004</b>
<b>Cu</b>	30 ppb	Disminución de la velocidad del nado a las 9 horas	<b>Understainer, 2003</b>
<b>Cu.SO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	0.09 mg/L	EC <sub>50</sub> a las 24-horas, disminución en la velocidad de alimentación	<b>Ferrando, 1993</b>



<b>Cu</b>	6.6 µg/L	Daño del ADN y mutaciones	<b>Atienzar, 2000</b>
<b>CuCl<sub>2</sub></b>	<b>6-18 µg/L</b>	<b>EC<sub>50</sub> a las 48-horas, sensibilidad a la toxicidad</b>	<b>Nebeker, 2009</b>

Debe señalarse, sin embargo, que las concentraciones consideradas tóxicas para organismos zooplanctónicos varían según la especie considerada (Ayers & Westcot, 1985; Cowgill & Milazzo; 1991; Untersteiner *et al.*, 2003). A escala de mesocosmos, se reportan valores tóxicos para el zooplancton entre 10 y 100 mg l<sup>-1</sup> (Kerrison *et al* 1988). En experimentos de tipo microcosmos, definidos por Kersting (1984) como un modelo físico que simula la totalidad o una parte de un ecosistema natural, Winner & Farrell (1978) comunican reducción de sobrevivencia en cuatro especies de *Daphnia* a concentraciones de cobre mayores a 40 mg l<sup>-1</sup> aunque *Daphnia magna* sólo mostró disminución en su tasa de crecimiento poblacional a concentraciones mayores a 60 mg l<sup>-1</sup>. Por su parte, Flemming & Trevors (1989) establecen un rango entre 5 y 86 mg l<sup>-1</sup> como tóxico para las especies del género *Daphnia*.

Diversas entidades gubernamentales y otras instituciones han ido definiendo límites máximos permisibles para el Cobre, en base a los estudios antes mencionados. Así, la Guía Canadiense de la Calidad del Agua, establece para el Cobre una concentración de 1 mg/l para aguas destinadas al ganado vacuno, 5 mg/l de concentración para aguas destinadas a la bebida del ganado porcino/aves y una concentración de 0.5 mg/l para aguas destinadas a la bebida del ganado ovino. Mientras que la FAO establece una concentración de 0.5 mg/l de Cobre para aguas destinadas a la bebida del ganado. En nuestro país, la ley General de Aguas establece una concentración de 0.5 mg/l de Cobre para aguas destinadas al riego de vegetales de consumo crudo y bebida de animales correspondientes a la clase III. La investigación realizada por la FAO, concluye que el Cobre entre 0.1 a 1 mg/l es tóxico para numerosos cultivos en concentraciones entre 0.1 a 1.0 mg/l en soluciones nutritivas. El Decreto Supremo

002-2008-MINAM de la legislación peruana, establece en cuanto a los estándares de calidad ambiental de agua, que el Cobre no debe superar el valor de 0.02 mg/L en ecosistemas acuáticos continentales (Categoría 4).

Dada la sabida toxicidad del Cobre, existe también una preocupación respecto a que sucede cuando este contaminante interactúa con otros componentes que pueden estar siendo vertidos en los cuerpos de agua o estén en contacto directo con el mismo. En el 2008, Gaete y Chávez realizaron una evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico con *Daphnia obtusa*. Los resultados mostraron que el Cobre tiene un efecto antagónico con el Cinc. Otro estudio, relacionó la interacción del Cobre con el Fullereno (Tao *et al.*, 2013) a través de la evaluación de la Concentración de Efectos No Observables (NOEC) en *Daphnia magna*. Los resultados de dicho experimento mostraron una disminución de la NOEC de Cobre en presencia de Fullereno; y demostró que la acumulación de Cobre en *D. magna* fue significativamente mayor a una baja concentración del nanocompuesto (100 mg/L), y que dicho metal se absorbía mucho más rápidamente debido a la presencia del Fullereno. Con esto se demuestra la alta capacidad transportadora del Fullereno para metales como el Cobre.

Sin embargo se han realizado pocas investigaciones respecto a la interacción del Cobre con otro tipo de contaminantes, entre ellos los artificiales. Se puede agregar incluso, la exposición de luz UV-Vis que está perjudicando hoy en día a muchos ecosistemas, debido a la pérdida progresiva de la capa de ozono.

## **2.4 INFLUENCIA DE LUZ UV SOBRE ECOSISTEMAS ACUÁTICOS**

El desarrollo natural de los ecosistemas acuáticos está influenciado por diversos factores abióticos. Uno de los principales es la radiación solar, la cual trae consigo rayos luminosos, rayos ultravioleta (UV) y rayos caloríficos. La radiación solar se

atenúa en la columna de agua, siendo varios los factores que contribuyen a esta atenuación. Si bien el agua absorbe parte de la radiación, los principales componentes responsables de este proceso son la concentración y propiedades ópticas de la materia orgánica disuelta (especialmente los compuestos carbonados) y la materia orgánica particulada (e.g., fitoplancton).

La radiación ultravioleta es la longitud de onda más fotoquímicamente reactiva de la energía solar que llega a la superficie de la tierra, y tiene una amplia gama de efectos en biogeoquímica acuática, la biota y los ecosistemas. Como resultado de los impactos antropogénicos en la atmósfera de la tierra, la exposición a la radiación UV en los ambientes árticos están cambiando sustancialmente. Aunque las emisiones antropogénicas de sustancias que agotan la capa de ozono han disminuido desde la ratificación del Protocolo de Montreal y sus enmiendas, los futuros niveles de ozono y la radiación UV en el Ártico son inciertos, dependiendo no sólo del cumplimiento continuo con el Protocolo y los cambios en la legislación, sino también sobre los efectos del cambio climático en las temperaturas y los gases traza. Como resultado de esto, se ha producido una pérdida masiva del ozono estratosférico sobre la Antártida durante las últimas dos décadas así como el agotamiento del ozono en el Ártico y ha sido mayor a latitudes medias.

Para comprender el impacto global de los cambios en los niveles de radiación UV, tienen que ser considerados los procesos sinérgicos y antagónicos resultantes del cambio climático ya que tienen el potencial de modificar el régimen de radiación UV bajo el agua y en consecuencia la presión sobre los organismos acuáticos (Milla y Korhola, 2002; Milla y Tartarotti, 2010).

La exposición a la radiación solar UV-Vis puede reducir la productividad, afectar la reproducción y el desarrollo; e incrementar la tasa de mutación en el fitoplancton y

microalgas. Incluso, existen numerosos estudios que demuestran que la radiación UV es capaz de afectar negativamente la actividad, el desarrollo y la supervivencia de los organismos acuáticos (Häder, 2003; Sinha R. *et al.*, 2002), principalmente el zooplancton (Zagarese & Williamson, 1998). Estos efectos van a depender de la transmisión de la radiación ultravioleta en la columna de agua.

Los efectos de la radiación UV-Vis en el medio acuático pueden tener un alcance desde el nivel molecular hasta todo el ecosistema. Hay sistemas donde la radiación UV-Vis afecta a un gran volumen del cuerpo de agua y donde la biota ha tenido que desarrollar mecanismos de protección y reparación. Estos mecanismos incluyen comportamientos migratorios verticales (Zagarese y Williamson, 1994), síntesis de pigmentos fotoprotectores (García – Pichel y Castenholz 1993, Sommaruga y García – Pichel, 1999) y de reparación del DNA (Jeffrey *et al.*, 1996; Rocco *et al.*, 2002), con implicaciones desde el punto de vista ecofisiológico como evolutivo. Estos sistemas se consideran mucho más vulnerables frente a la radiación UV-Vis, aunque su biota es mucho más resistente.

El daño fotobiológico incluye los efectos directos de la radiación UV-Vis en la que los fotones son absorbidos por las moléculas biológicas tales como ácidos nucleicos y proteínas que luego se someten a una alteración fotoquímica. Una vía alternativa de daño es a través de la interacción de la radiación UV-Vis y compuestos orgánicos u otros agentes fotosensibilizantes para producir especies reactivas de oxígeno tales como superóxido y radicales hidroxilo (Socoowski *et al.*, 2012). Estos pueden difundir lejos del sitio de producción y causar daño oxidativo a las enzimas, lípidos de membranas, y otros constituyentes celulares.

Los cambios en la exposición a la radiación UV bajo el agua pueden afectar directamente la composición de especies de la biota acuática en cada nivel trófico

(Mostajir, B. *et al.*, 1999). Así, varios estudios de especies de invertebrados de agua dulce han reportado un aumento de la mortalidad en respuesta al aumento de los niveles de radiación UV, especialmente el zooplancton (Leech, *et al.*, 2000). Pero además se tiene que tener en cuenta que la variación en la tolerancia a la radiación UV es alta entre las especies y etapas de la vida (Leech, *et al.*, 2000). En general, al zooplancton pequeño (rotíferos pequeños) se le considera con una alta tolerancia a la radiación UV, mientras que las especies grandes varían en su tolerancia tanto entre y dentro de las especies.

Leech y Williamson (2001) encontraron que los cladóceros tenían la tolerancia más baja a la radiación UV y exhibieron gran variabilidad entre las especies. *Daphnia* fue uno de los grupos más sensibles de los organismos (Tollrian *et al* 2004) , mientras que el calanoide adulto y los copépodos ciclopoideos tenían altas tolerancias de radiación UV. Sin embargo, se vio también que las clonas pigmentadas de *Daphnia* eran más tolerantes a la radiación UV que las clonas transparentes (Rautio, M. *et al.*, 2002), y la pigmentación parece aumentar en respuesta a una mayor exposición de la radiación UV (Little, E. *et al.*, 1994).

## **2.5 DAPHNIA COMO ORGANISMO ECOLÓGICAMENTE RELEVANTE Y COMO MODELO DE ESTUDIO**

Dentro del grupo de cladóceros, las especies del género *Daphnia* son las más utilizadas como organismos de prueba o de referencia en pruebas de toxicidad. La amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen al interior de la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética (lo cual asegura una uniformidad de respuesta) y el corto ciclo de vida

con la producción de un alto número de crías, han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad, de carácter universal (Dodson & Hanazato, 1995).

El género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladóceros de la clase crustácea, y especies como *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* y *Daphnia similis*. Sin embargo, la primera especie es más comúnmente utilizada extensivamente en pruebas de toxicidad, por lo cual existe una extensa información sobre las técnicas de cultivo, los requisitos de temperatura, luz y nutrientes, así como su respuesta a muchos tóxicos. Específicamente, los ensayos de toxicidad con *D. magna* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros.

En las pruebas de toxicidad con *Daphnia magna* (Straus), neonatos menores de 24 h de edad son expuestos a la muestra o compuesto a probar, por un periodo de 48 h, al término del cual se cuantifica el número de organismos muertos (Ferrando *et al*; 1999; Withman & Miller, 1982). Con estos resultados se establece la proporción o porcentaje de mortalidad producida.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto contaminante del Fulereo, Cobre y Luz UV en el comportamiento y respuesta fisiológica de *Daphnia magna*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el  $DL_{50}$  y  $EC_{50}$  de *Daphnia magna* sometidas al Fulereo y el Cobre.
- Determinar el efecto de la interacción del Fulereo y Cobre sobre el comportamiento y respuesta fisiológica de *Daphnia magna*.
- Determinar el efecto de la pre y post-exposición a la Luz UV sobre el comportamiento y respuesta fisiológica de *Daphnia magna* previamente sometida al Fulereo, Cobre y su interacción.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizó un cultivo mixto de individuos de *Daphnia* adquirido en el Acuario Cleo. Sólo se consideró la especie *Daphnia magna*, la cual fue separada con la ayuda de un estereoscopio y colocadas en recipientes especiales.

Reino	:	Animalia
Phylum	:	Arthropoda
Subphylum	:	Crustacea
Clase	:	Branchiopoda
Orden	:	Cladocera
Familia	:	Daphniidae
Género	:	<i>Daphnia</i>
Especie	:	<i>D. magna</i>

Ilustración Nº 1: *Daphnia magna*.

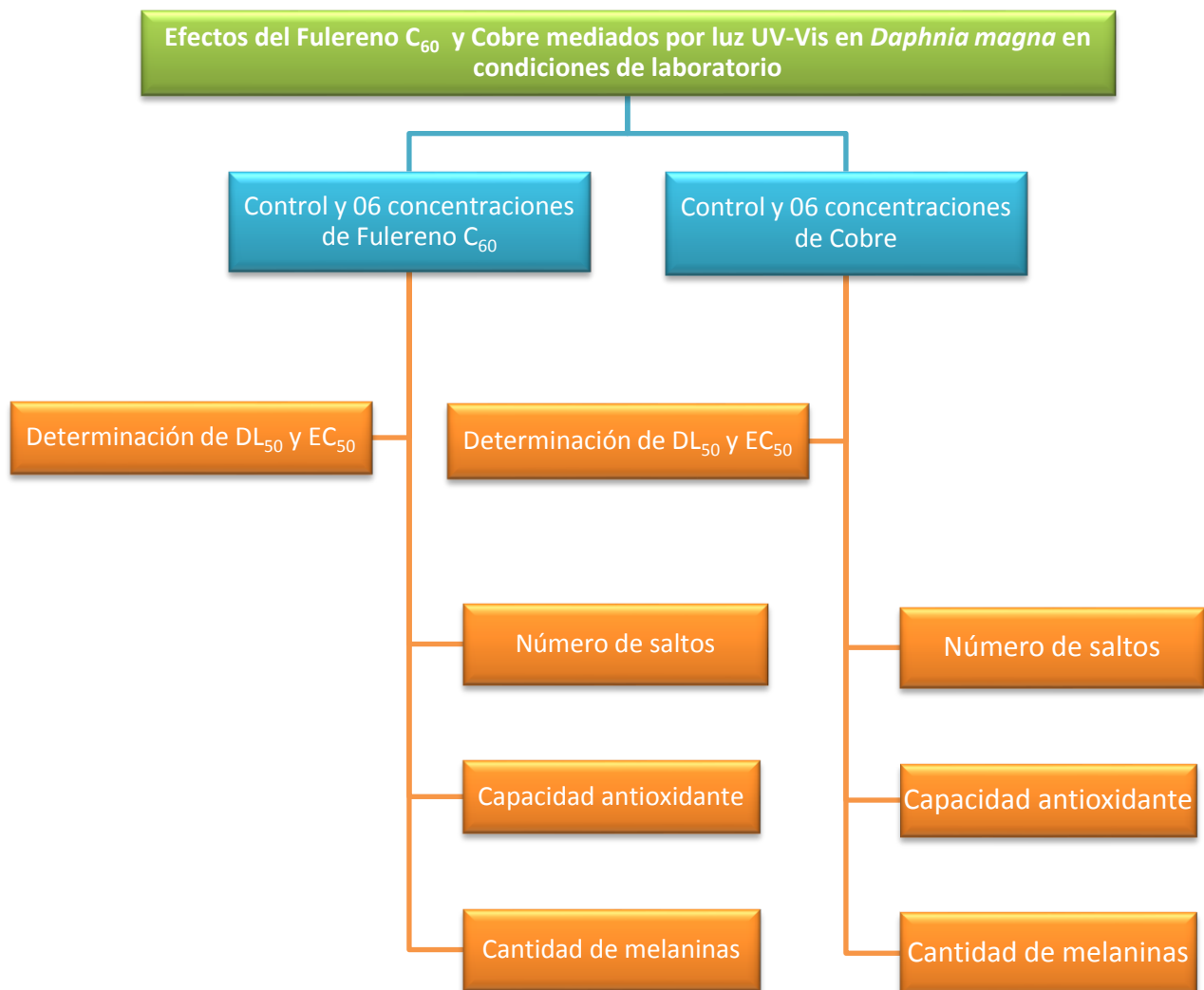




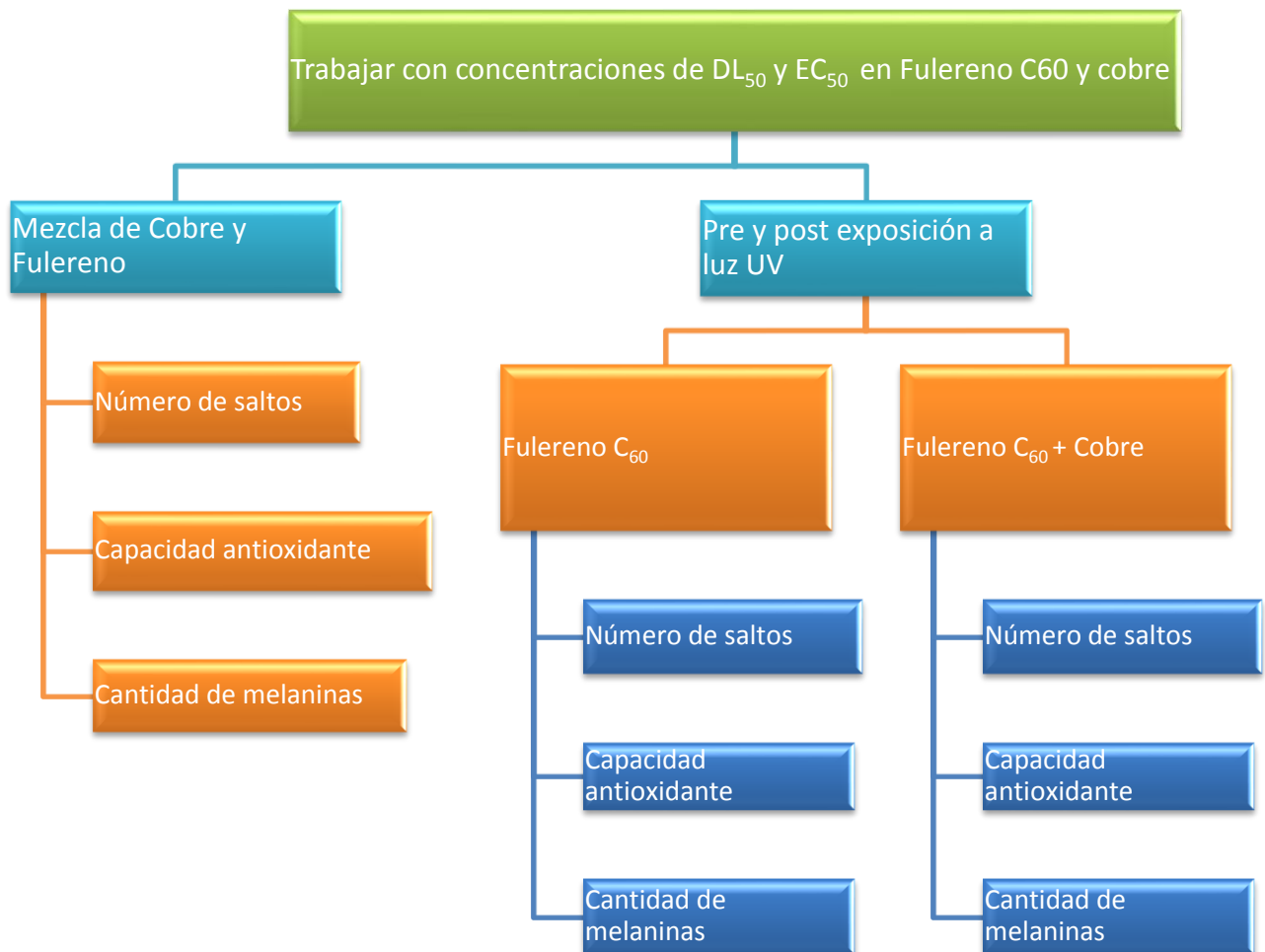
## 4.2 METODOLOGÍA

**Esquema Nº 1:** Procedimiento de experimentación de Fulereno C<sub>60</sub> en *Daphnia magna*.

### PARTE A: DETERMINACIÓN DE LC<sub>50</sub> Y EC<sub>50</sub>.



**PARTE B: EXPERIMENTACIÓN DE MEZCLA DE FULERENO C<sub>60</sub> CON COBRE Y EXPOSICIÓN A LUZ UV.**



#### **4.2.1 CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE *Daphnia magna***

Los individuos de *Daphnia magna* fueron aislados a partir de un cultivo mixto adquirido en un acuario. Hembras grávidas identificadas como *Daphnia magna* (Strauss, 1820) fueron colocadas en beakers de 600 mL conteniendo 500 mL de agua declorinada. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz con un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, oxigenación constante, temperatura media de 20°C y fueron alimentadas con Nutrafiin basic® (3g) suplementado con levadura (0.05g) aplicando una dosis diaria de 1 mL (Pieters, 2007).

El cultivo se monitoreó cada 24 horas y los neonatos generados fueron separados en cultivos individuales en recipientes de 5L garantizando así tener cultivos homogéneos en base a clonas.

Los materiales empleados se lavaron previamente con ácido nítrico al 10%. El agua usada en los cultivos fue declorinada por aireación durante 48 horas y los recipientes se limpiaron cada dos días removiendo restos de mudas y alimento del fondo del recipiente y cambiando el 50% del agua. .

#### **4.2.2 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE FULERENO C<sub>60</sub>**

Para la preparación de la solución de Fullerenos (C<sub>60</sub>) se adicionó 200 mg para 1 L de agua MilliQ. Esta suspensión se mantuvo en agitación constante en un agitador magnético bajo condiciones de iluminación durante dos meses. Al término del proceso la suspensión adquirió un color marrón debido a la formación del coloide de Fullerenos. Dicha solución se sometió a centrifugación de 25000 rpm durante una hora a 15°C. El sobrenadante se colocó en dos

envases oscuros de vidrio (500mL). Finalmente, el sobrenadante fue filtrado con una membrana de 0.20  $\mu\text{m}$  y una jeringa de 10mL. El filtrado se almacenó en un beaker de 100mL, para luego concentrarlo diez veces por evaporación, con ayuda de un rotoevaporador.

La concentración fue estimada midiendo la concentración de carbono total con un analizador de carbono total TOC-V CPH (Shimadzu). La suspensión filtrada fue caracterizada usando un Microscopio electrónico de transmisión JEOL JSM 1200 EX II operando a 100 kV. Aproximadamente 30  $\mu\text{L}$  de la muestra de  $\text{C}_{60}$  fue colocada sobre una malla de 300- $\mu\text{m}$  Mesh TEM Grids (SPI). El análisis se desarrolló después de 24 horas luego de la evaporación de la muestra (Lyon *et al.* 2006).

Luego del proceso de concentración, la solución resultante se colocó en viales de 15mL, los cuales fueron forrados con papel platino y rotulados indicándose el nombre y la concentración correspondiente, para luego ser usados en los ensayos.

Cabe mencionar, que todos los recipientes de vidrio empleados en la preparación de la solución de Fulereno (200mg/L), fueron acidificados con ácido nítrico 10% durante 24 horas.

#### 4.2.3 DETERMINACIÓN DE EC<sub>50</sub> Y DL<sub>50</sub> PARA COBRE Y FULERENO C<sub>60</sub>

Se aplicó dos criterios toxicológicos, el primero la DL<sub>50</sub> que representa la concentración de un compuesto capaz de causar la mortalidad del 50% de la población. El segundo, la EC<sub>50</sub> que refleja la concentración de un compuesto capaz de causar un efecto en el 50% de la población. Los parámetros a evaluar serán la mortalidad y la frecuencia de saltos por minuto respectivamente.

Los ensayos fueron realizados en viales de 20 mL con n=10 y duración de 48h y un fotoperiodo de 16 luz/8 oscuridad. Las concentraciones usadas fueron las que se detallan en la siguiente tabla. Los valores de EC<sub>50</sub> y DL<sub>50</sub> fueron calculados mediante el programa PROBIT.

**Tabla Nº 4:** Concentraciones de cobre y Fullereno C<sub>60</sub> en la determinación de la DL<sub>50</sub> y EC<sub>50</sub>.

Cu (ppm)	Fullereno C <sub>60</sub> (mg/L)
0	0
1	4
0.5	2
0.25	1
0.125	0.5
0.06	0.25
0.031	0.125

##### a) Evaluación de la frecuencia de saltos y mortalidad.

Se usó la frecuencia de saltos como un parámetro de impacto fisiológico generado por la exposición a cobre y Fullereno C<sub>60</sub>. Esta determinación fue una modificación de la metodología descrita por Lovern, 2007. Al término de la 48 h de exposición del ensayo toxicológico se filmó el sistema durante 5 minutos con

una cámara digital (Cannon Powershot). Las imágenes fueron analizadas con el programa Windows Movie Maker y por medio de un contador de células se contó el número de saltos por minuto en cada una de las réplicas. Estos datos fueron usados para el cálculo de la EC<sub>50</sub>. Además, se contaron los individuos muertos para determinar la DL<sub>50</sub>, teniendo como criterio esperar 10 segundos evaluando si el organismo presenta aun movimiento.

**b) Medición de la capacidad antioxidante con el Método del DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazilo):**

Se colectaron “dafnias” de cada vial, y se trituraron mecánicamente con un estilete, resuspendidas en 350µL de PBS para luego ser sonicadas a 40Hzt por 15 minutos. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 3500 rpm, se recuperó el sobrenadante y se almacenó los restos de exoesqueleto para el análisis de melanina.

El análisis de capacidad antioxidante total se determinó siguiendo la metodología descrita por Flores *et al.*, 2008. El ensayo fue realizado en placas Elisa de 96 pozos en las cuales se colocó un blanco de muestra, 100 uL de muestra más 200 uL y una muestra patrón que solo contendrá el reactivo DPPH y PBS. Las muestras fueron colocadas por triplicado y la lectura se realizó a 517nm. El cálculo de la capacidad antioxidante total se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$CA = \frac{1 - (abs\ blanco - abs\ muestra)}{abs\ patrón} \times 100$$

### c) Medición de Melaninas:

Para el análisis de melaninas se usaron los exoesqueletos recuperados del ensayo anterior. Las muestras fueron secadas a 40°C durante 24 h y pesadas en una balanza analítica. Se calculó el peso de la muestra en relación al peso inicial del tubo que contenía la muestra. Se resuspendió el exoesqueleto en 1 mL de NaOH 5N. Las muestras fueron sonicadas a 40 Hz durante 15 minutos y se agregaron 10 uL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%; se mezclaron bien y se colocaron en baño maría a 60°C durante 24 h. Finalmente se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante que fue leído en un espectrofotómetro con luz UV a 350 nm. Para el cálculo de la concentración de melanina se tomó el coeficiente de extinción para melanina (10.19) aplicando la siguiente formula (los resultados fueron expresados en ug.mg de peso seco):

$$CC \text{ melanina} = \frac{\text{lectura espectrofotómetro (ug de pigmento)}}{\text{peso seco de la muestra (mg)}} / 10.19$$

#### 4.2.4 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE MEZCLA DE FULERENO (C<sub>60</sub>) Y COBRE (Cu)

Los ensayos de mezcla de contaminantes fueron determinados en base a los resultados obtenidos en la determinación de EC<sub>50</sub> para cobre y Fullerenos C<sub>60</sub>, siendo los valores los que se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla N° 5:** Dosis usadas para ensayo de mezcla de metales.

Cu (ppm)	Fullereno C <sub>60</sub> (mg/L)
0.5 mg/L	4 mg/L

El ensayo duró 48 h y después se realizaron los ensayos de determinación de capacidad antioxidante total y cuantificación de melanina como se indica en el punto c).

#### **4.2.5 ENSAYOS DE PRE Y POST IRRADIACIÓN CON UV-VIS**

Son varios autores los que han señalado el efecto de la radiación sobre la actividad de la nanopartícula Fulereno  $C_{60}$  (Kamat *et al.*, 1998). En esta etapa del proyecto se evaluó el efecto de una pre o post irradiación de Fulereno  $C_{60}$  en correspondencia con su toxicidad. El sistema para la pre irradiación fue montado de la siguiente manera; se colocó 20 mL de agua de clorinada con 4mg/L de la suspensión de Fulereno y un frasco control sin Fulereno. Los frascos fueron irradiados durante 5 horas y luego se colocaron 10 dafnias por frasco. En el caso de la post irradiación el sistema fue montado por completo antes de la irradiación; después de las primeras 24h el sistema fue irradiado durante 5 h. El mismo procedimiento se llevó a cabo con la mezcla de contaminantes usando para Fulereno la concentración  $EC_{50}$  hallada y para cobre su concentración  $EC_{50}$  hallada.

Finalmente para ambos tratamientos se determinó la frecuencia de saltos, capacidad antioxidante total y se cuantificaron melaninas.

#### **4.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

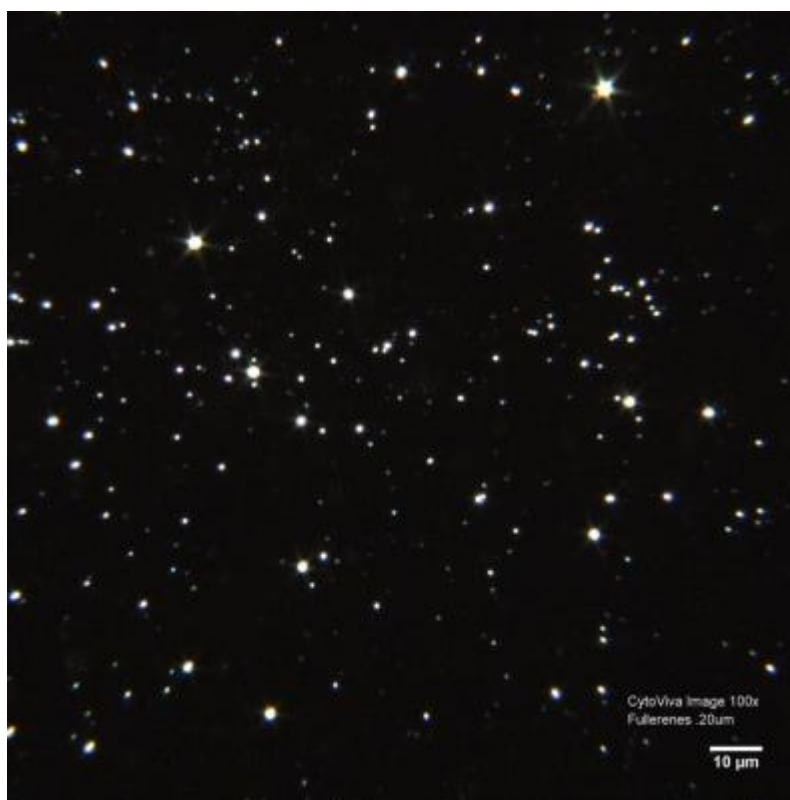
Se aplicó un análisis de varianza ANOVA one way para establecer las diferencias en pre tratamientos y un análisis a posteriori de Dunet's para evaluar las diferencias de cada tratamiento con respecto al control. El análisis tuvo un rango de confianza de 95%.



## V. RESULTADOS

### 5.1 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE FULERENO

Como se muestra en la **Ilustración N° 2**, se observa una alta proporción de agregados de la solución acuosa del fullereno que pueden ser considerados en la escala nanométrica teniendo en cuenta para ello su tamaño, lo que permite inferir que cualquier efecto observado se debe a la exposición de nano-agregados de  $C_{60}$ .



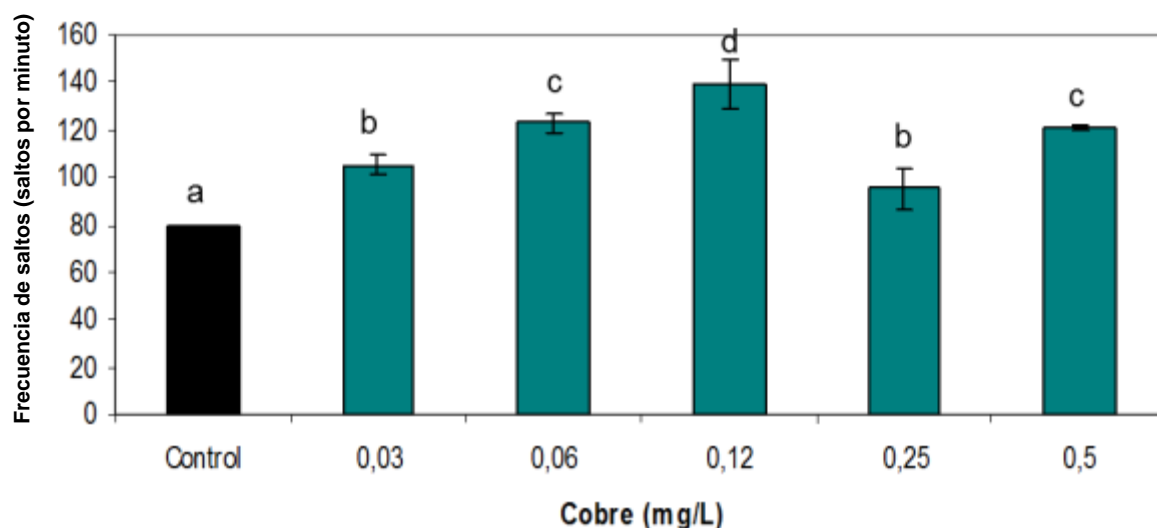
**Ilustración N° 2:** Nanopartículas obtenidas después de agitar el Fullereno ( $C_{60}$ ) en agua Milli Q durante dos meses.

Las microfotografía (Véase Ilustración N° 2) muestra los agregados de C<sub>60</sub> en solución acuosa obtenida por microscopía de campo oscuro (Objetivo de 100X, con aceite de inmersión).

## 5.2 DETERMINACIÓN DE EC<sub>50</sub> Y DL<sub>50</sub> PARA COBRE Y FULERENO C<sub>60</sub>

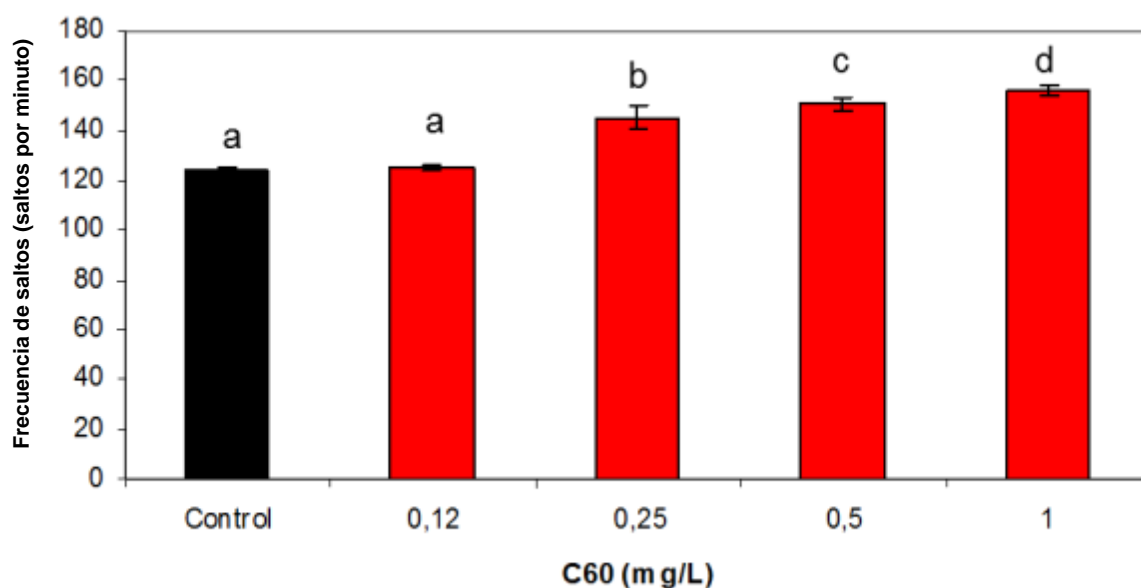
### 5.2.1 EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE SALTOS Y MORTALIDAD.

Los individuos de *Daphnia magna* expuestos al ensayo con Cobre en seis diferentes concentraciones, muestran que la EC<sub>50</sub> resultante fue de 0.5 mg/L y la DL<sub>50</sub> de 0.21 mg/L. En la **Gráfico N° 1** se muestra que en la concentración de 0.12 mg/L se obtiene un pico máximo de saltos/minuto para luego mostrar una caída de saltos sin llegar a la normalidad de la muestra control. Además, nos indican diferencias estadísticas significativas entre el control y todas las concentraciones de cobre, mientras que para el caso de las concentraciones de 0.03 y 0.25 mg Cu/L y; 0.06 y 0.5 mg Cu/L no existe diferencias significativas.



**Gráfico N° 1:** Frecuencia de saltos de *Daphnia magna* después de la exposición al Cobre (a). Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).

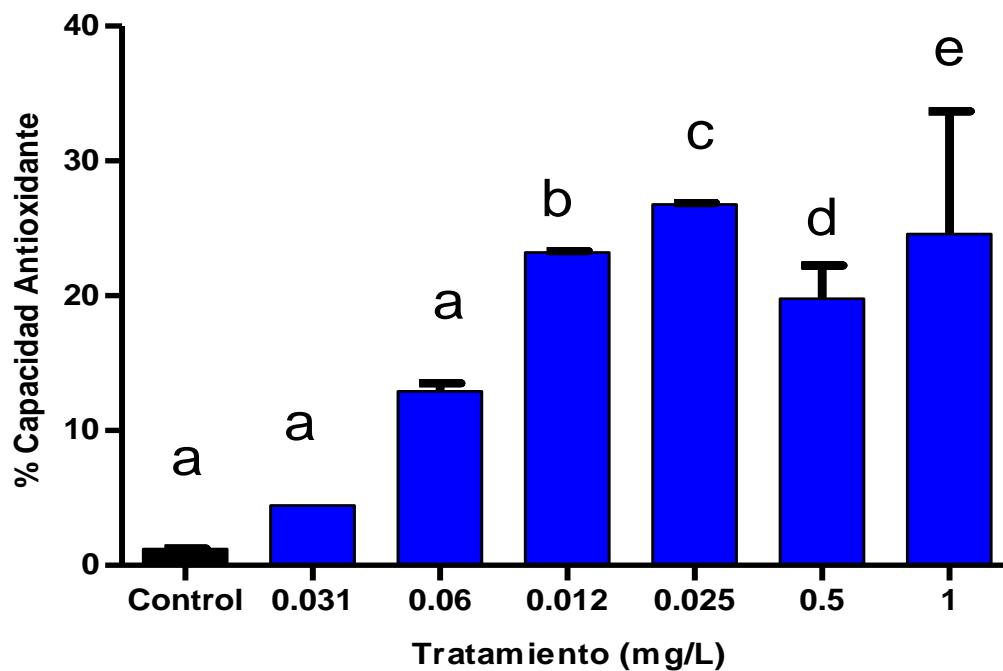
Para el caso de Fulereno ( $C_{60}$ ), la  $EC_{50}$  resultante fue de 4 mg/L y la  $DL_{50}$  de 4.8 mg/L. En el **Gráfico Nº 2** se muestra que en la concentración de 1 mg/L se obtiene un pico máximo de saltos/minuto. Además, se observan diferencias estadísticas significativas entre el control y las concentraciones de 0.25, 0.5 y 1 mg  $C_{60}$ /L, mientras que con la concentración de 0.12 mg  $C_{60}$ /L no existe diferencias significativas.



**Gráfico Nº 2:** Frecuencia de saltos de *Daphnia magna* después de la exposición al Fulereno. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).

### 5.2.2 MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE CON EL MÉTODO DEL DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRIL HIDRAZIL)

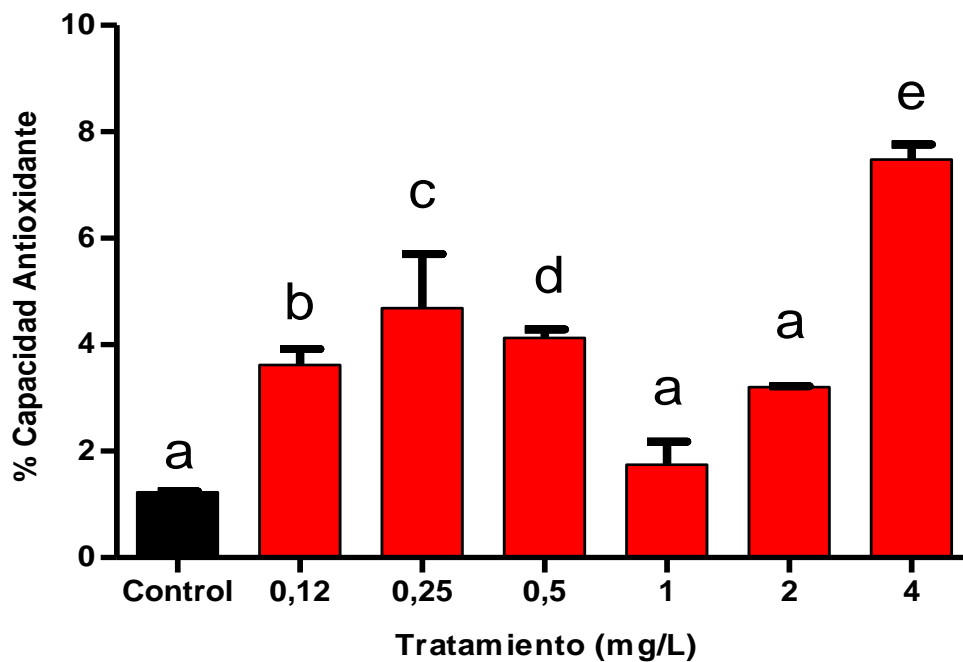
En el **Gráfico Nº 3**, se muestra que el porcentaje de capacidad antioxidante para Cobre que presenta un valor alto en la concentración de 0.25 mg/L. Además, existen diferencias estadísticas significativas entre el grupo control y los ensayos de las concentraciones 0.12; 0.25; 0.5 y 4 mg Cu/L.



**Gráfico Nº 3:** Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de *Daphnia magna* después de la exposición a Cobre. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).

En el **Gráfico Nº 4** se observan los resultados del porcentaje de capacidad antioxidante para Fullerenos, los cuales muestran diferentes respuestas a las diversas concentraciones, mostrando una mayor capacidad antioxidante con la concentración de 4 mg/L.

La capacidad antioxidante total después de la exposición al Cobre (48 horas) fue alterada (**Gráfico Nº 3**;  $p > 0.05$ ). Se registró un resultado similar después del tratamiento con  $C_{60}$ , donde la mayoría de las concentraciones ensayadas con  $C_{60}$  mostraron una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p > 0.05$ ), registrándose una diferencia significativa entre las dafnias expuestas a 0.12; 0.25; 0.5 y 4.0 mg/L, con una muy baja capacidad de captación al 1.0 mg  $C_{60}$  mg/L (**Gráfico Nº 4**).



**Gráfico Nº 4:** Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de *Daphnia magna* después de la exposición a Fulereno ( $C_{60}$ ). Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).

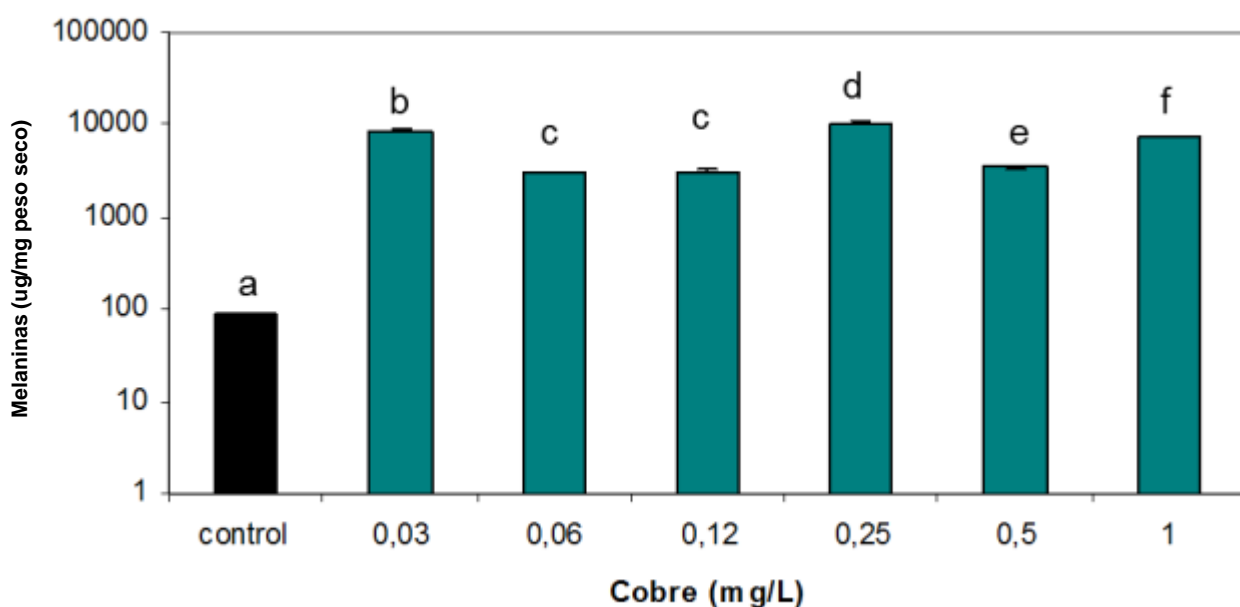
### 5.2.3 MEDICIÓN DE MELANINAS

Después de 48 horas de tratamiento, se realizó la medición de melaninas en *Daphnia magna* tanto para las diferentes concentraciones de Fulereno ( $C_{60}$ ) como de Cobre (Cu).

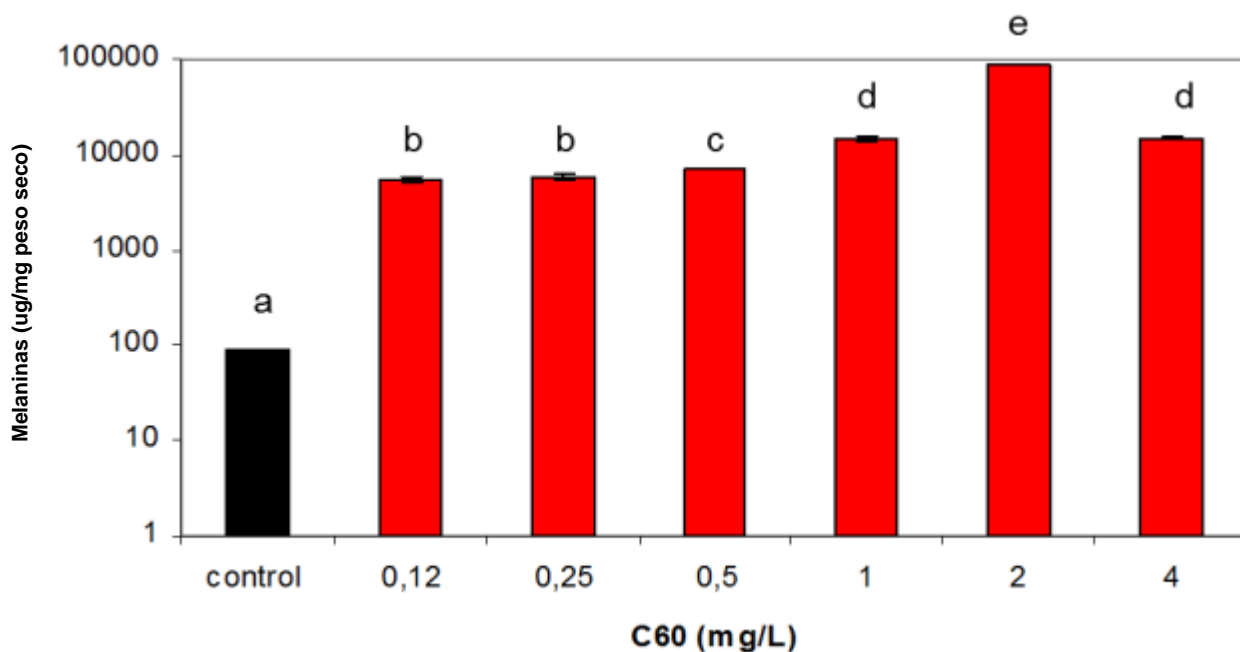
En el caso de Cobre (**Gráfico Nº 5**), todas las concentraciones tienen diferencias significativas con el grupo control ( $p > 0.05$ ). Sin embargo no existieron dichas diferencias entre las concentraciones 0.06 y 0.12 mg/L ( $p > 0.05$ ). La mayor cantidad de melaninas se observó en la concentración de 0.25 mg/L.

En el caso de la exposición de *Daphnia magna* a Fulereno, se observaron diferencias significativas con el grupo control ( $p > 0.05$ ) en todas las concentraciones ensayadas (**Gráfico Nº 6**). Sin embargo no existieron dichas

diferencias entre las concentraciones 0.12 y 0.25 mg/L, y 1.0 y 4.0 mg/L ( $p>0.05$ ). La mayor cantidad de melaninas se observó en la concentración de 2.0 mg/L.



**Gráfico Nº 5:** Cantidad total de Melaninas (ug/mg peso seco) en *Daphnia magna* después de la exposición a Cobre (Cu). Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ).

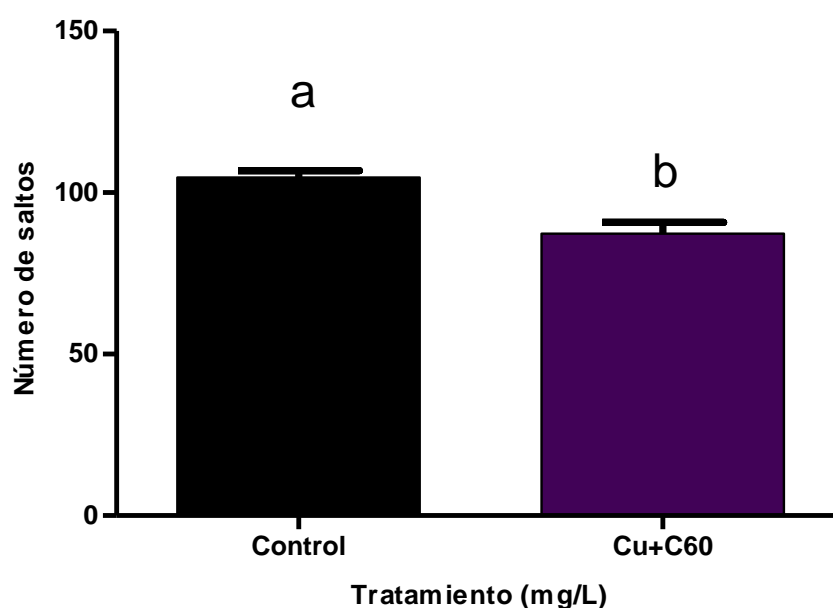


**Gráfico Nº 6:** Cantidad total de Melaninas (ug/mg peso seco) en *Daphnia magna* después de la exposición a Fulereno ( $C_{60}$ ). Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ).

### 5.3 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE MEZCLA DE FULERENO (C<sub>60</sub>) Y COBRE (Cu)

Para la mezcla de Fulereno (C<sub>60</sub>) y Cobre se ensayó con las EC<sub>50</sub> resultantes de los ensayos anteriores para ambos compuestos, siendo de 4 mg/L y 0.5 mg/L respectivamente.

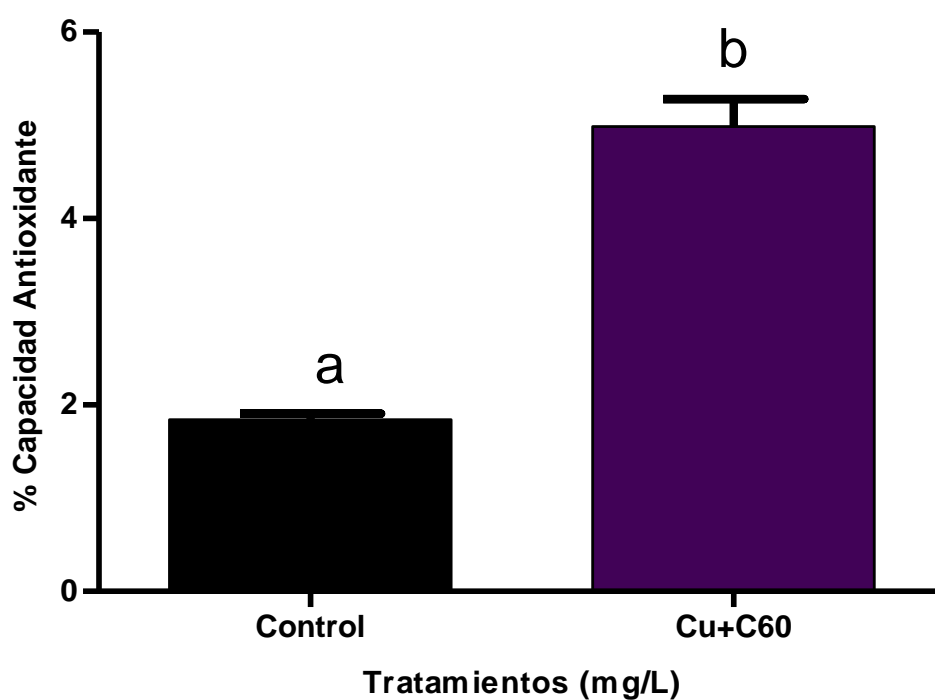
En el **Gráfico Nº 7** se muestra que hubo una disminución en la frecuencia de saltos, desde un promedio de 105 a 87 saltos/minuto. Además, nos indican diferencias estadísticas significativas entre el control y el ensayo.



**Gráfico Nº 7:** Frecuencia de saltos de *Daphnia magna* después de la exposición a la mezcla de Fulereno y Cobre. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).

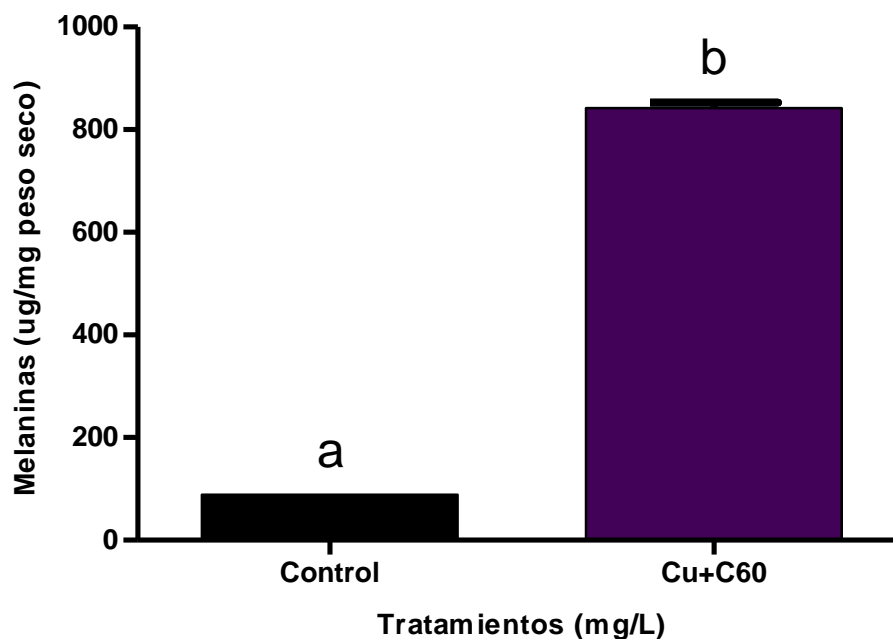
En el **Gráfico Nº 8**, se muestran los resultados del porcentaje de capacidad antioxidante para la mezcla de Fulereno (C<sub>60</sub>) y Cobre, los cuales indican una respuesta con un incremento del 3% de la capacidad antioxidante con respecto al grupo control. Ambos tratamientos presentan diferencias estadísticas significativas.

Para el ensayo de cantidad de melaninas en la mezcla de ambos compuestos, encontramos que *Daphnia magna* produjo cerca de 900 ug/mg.peso seco en respuesta a las concentraciones a las que se le sometió. Además, existen diferencias significativas entre ambos tratamientos (**Gráfico N° 9**).



**Gráfico N° 8:** Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de *Daphnia magna* después de la exposición a la mezcla de Fullerenos ( $C_{60}$ ) y Cobre. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).





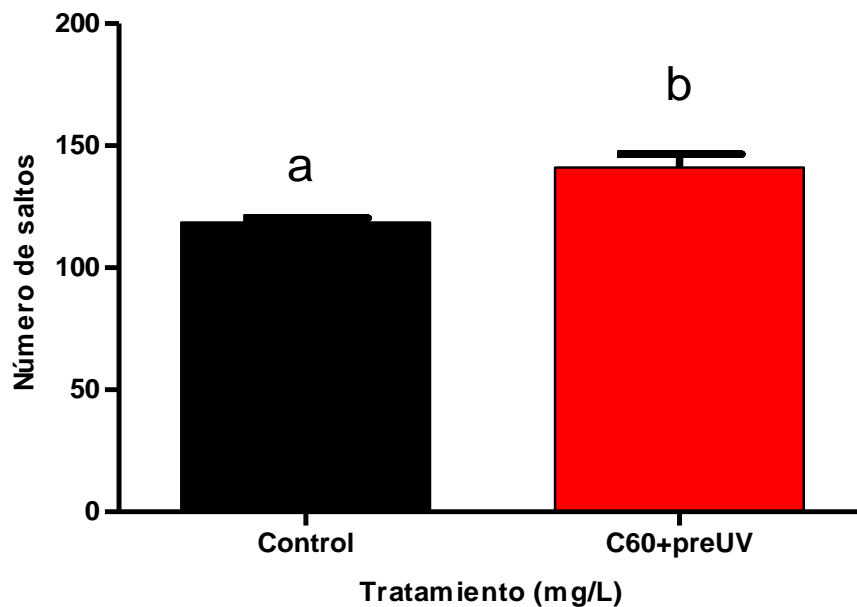
**Gráfico N° 9:** Cantidad total de Melaninas (ug/mg peso seco) en *Daphnia magna* después de la exposición a la mezcla de Fullereno ( $C_{60}$ ) y Cobre. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).

## 5.4 ENSAYOS DE PRE Y POST IRRADIACIÓN CON UV-VIS

### 5.4.1 PRE IRRADIACIÓN A LUZ UV-VIS

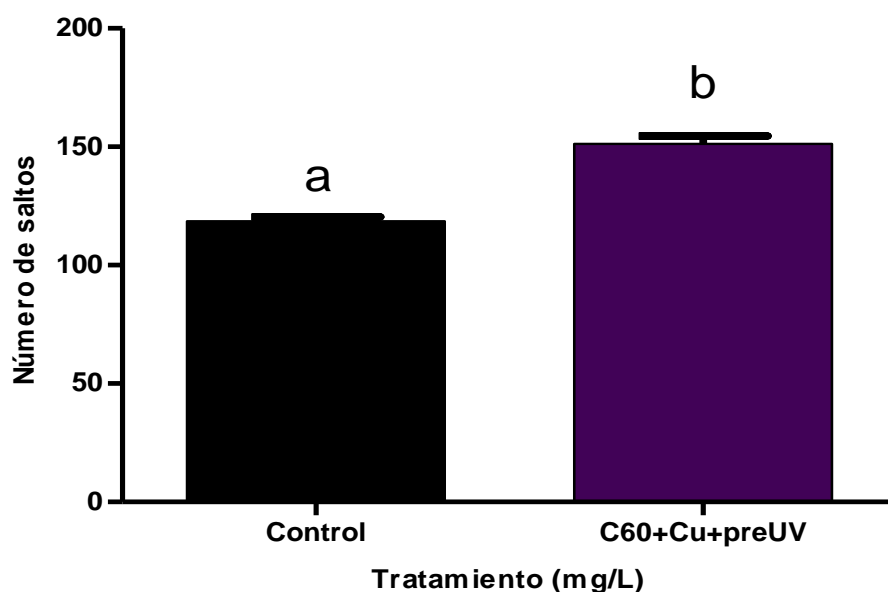
Para este ensayo se trabajó con las  $EC_{50}$  resultantes en los ensayos anteriores para Fullereno ( $C_{60}$ ) y Cobre, siendo de 4 mg/L y 0.5 mg/L respectivamente.

En el **Gráfico N° 10**, se observa que hubo un incremento en la frecuencia de saltos de *Daphnia magna* luego de la exposición a Fullereno ( $C_{60}$ ) pre-irradiado con luz UV-Vis, de un promedio de 119 a 141 saltos/minuto con respecto al control. También, hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos.



**Gráfico N° 10:** Frecuencia de saltos de *Daphnia magna* después de la exposición a Fulereno (C<sub>60</sub>) pre-irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ).

Asimismo, cuando se pre-irradió el ensayo con la mezcla de Fulereno (C<sub>60</sub>) y Cobre, se observó que también se reportó un incremento de 119 a 151 saltos/minuto y que además hubo diferencias significativas con respecto al Control (**Gráfico N° 11**).

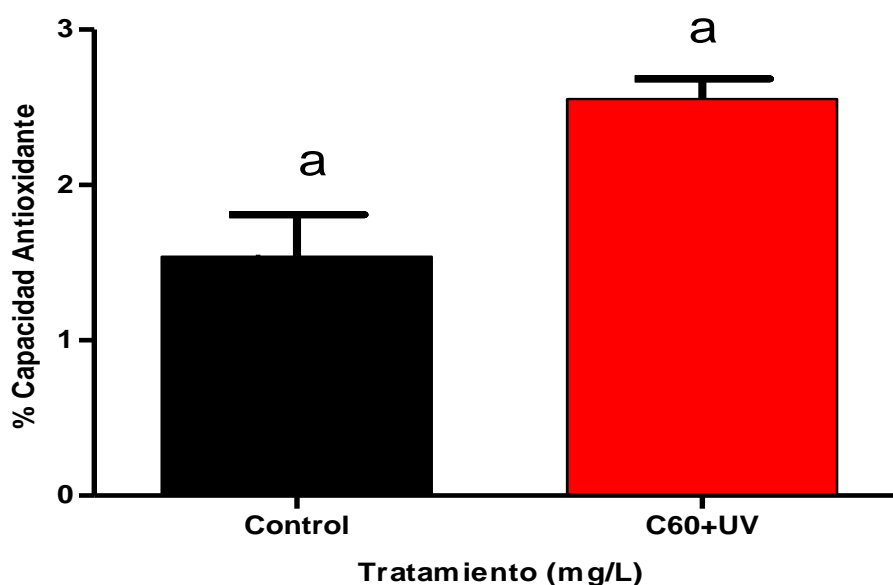


**Gráfico N° 11:** Frecuencia de saltos de *Daphnia magna* después de la exposición a la mezcla de Fulereno (C<sub>60</sub>) y Cobre pre-irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un

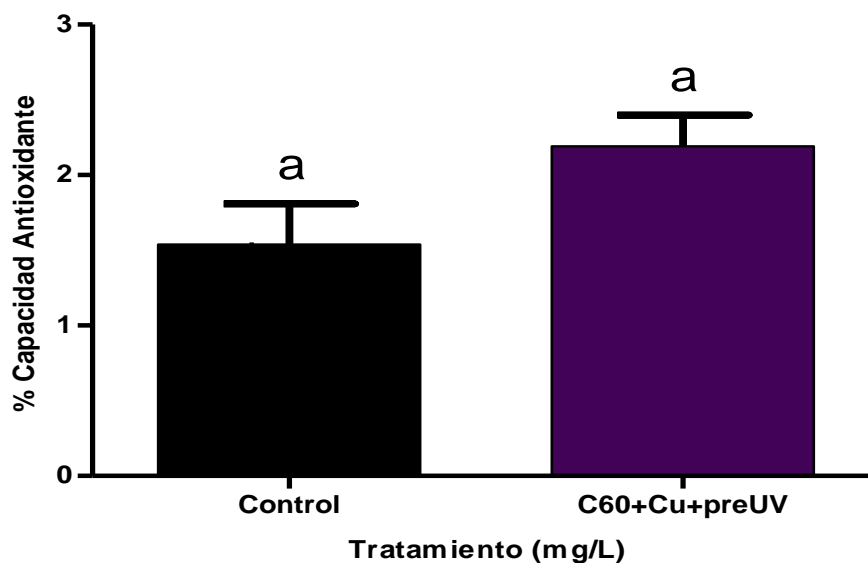
error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).

En cuanto a la Capacidad antioxidante considerando sólo el Fulereo ( $C_{60}$ ), se tuvo como resultado un incremento de alrededor de un 1% sobre el grupo control, como lo muestra el **Gráfico Nº 12**. También se aprecia que no hubo diferencias estadísticas significativas entre ambos tratamientos.

Mientras que para los ensayo de pre-irradiación de Fulereo ( $C_{60}$ ) y Cobre con luz UV-Vis, se encontró un aumento de alrededor de 0.5% de la Capacidad Antioxidante respecto al Control; no registrándose diferencias significativas en ambos tratamientos (**Gráfico Nº 13**).

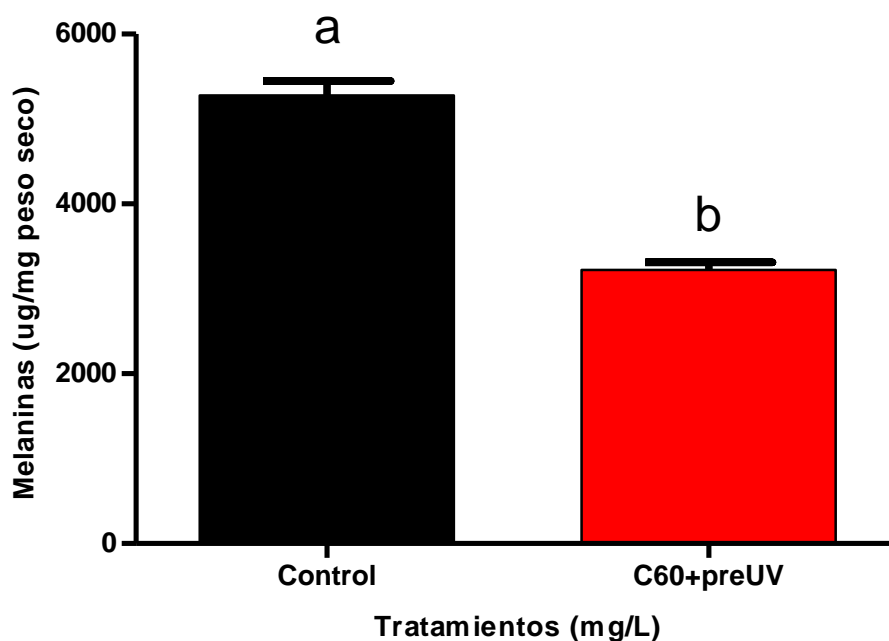


**Gráfico Nº 12:** Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de *Daphnia magna* después de la exposición a Fulereo ( $C_{60}$ ) pre-irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras similares indican ausencia de diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

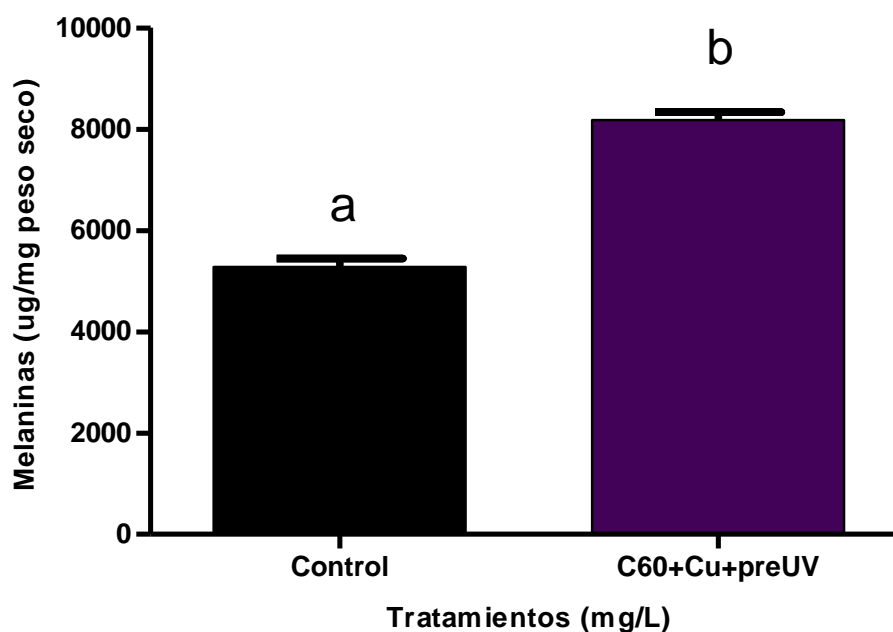


**Gráfico Nº 13:** Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de *Daphnia magna* después de la exposición a la mezcla de Fulereno ( $C_{60}$ ) y Cobre pre-irradiados con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras similares indican ausencia de diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

En cuanto a las melaninas halladas en ambos tratamientos, se encontró que para el caso del tratamiento de Fulereno ( $C_{60}$ ) previamente irradiado, la cantidad de estas tuvo una disminución en alrededor del 50% presentes en el grupo control (**Gráfico Nº 14**), mientras que cuando el Fulereno ( $C_{60}$ ) se encontraba mezclado con Cobre y se irradiaba antes con luz UV-Vis, la cantidad de Melaninas experimentó un incremento de alrededor del 20% respecto al grupo control (**Gráfico Nº 15**). Tanto en la pre-exposición del Fulereno como la mezcla con Cobre, se obtuvieron diferencias estadísticas significativas.



**Gráfico N° 14:** Cantidad total de Melaninas (ug/mg peso seco) en *Daphnia magna* después de la exposición a Fullereno ( $C_{60}$ ) previamente irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).



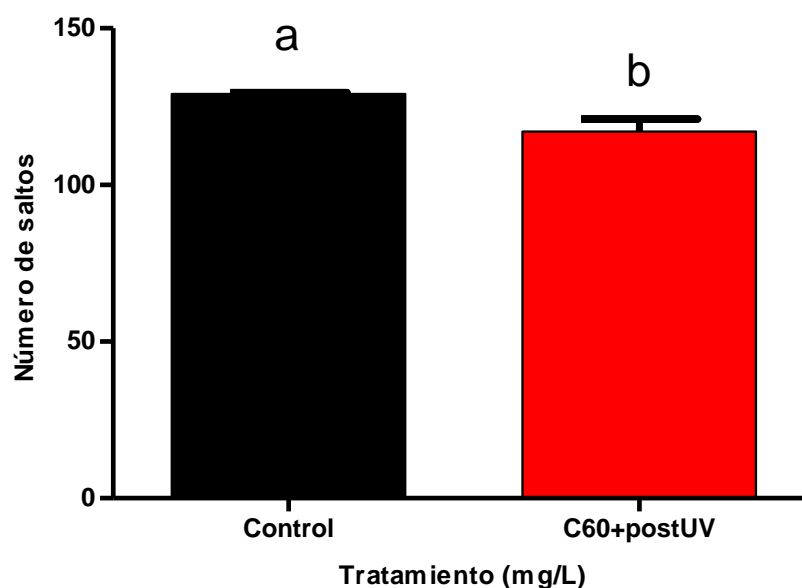
**Gráfico N° 15:** Cantidad total de Melaninas (ug/mg peso seco) en *Daphnia magna* después de la exposición a la mezcla de Fullereno ( $C_{60}$ ) y Cobre previamente irradiado. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).

#### 5.4.2 POST IRRADIACIÓN A LUZ UV-VIS

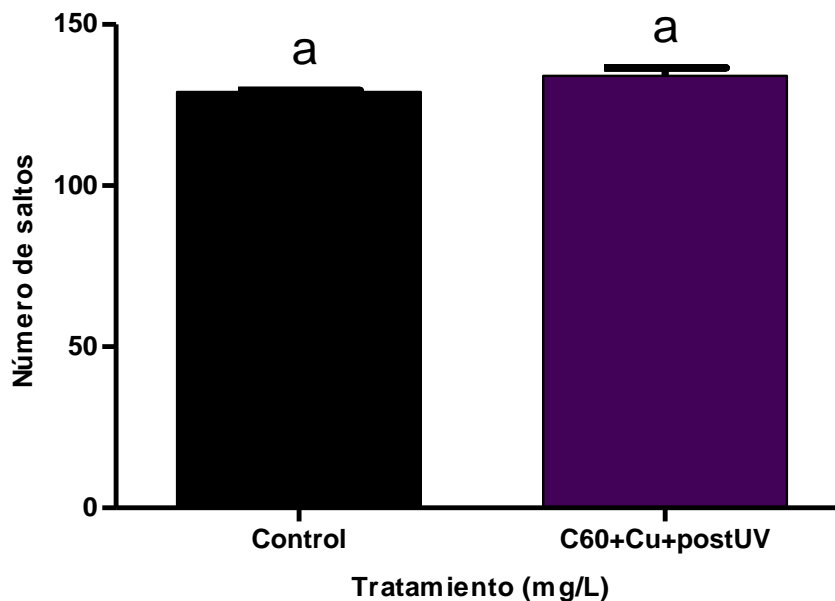
Para este ensayo se trabajó con las  $EC_{50}$  resultantes en los ensayos anteriores para Fulereno ( $C_{60}$ ) y Cobre, siendo de 4 mg/L y 0.5 mg/L respectivamente.

En el **Gráfico N° 16**, se observa que hubo una disminución en la frecuencia de saltos de *Daphnia magna* luego de la exposición a Fulereno ( $C_{60}$ ) post-irradiado con luz UV-Vis, de un promedio de 129 a 117 saltos/minuto con respecto al control. También, hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos.

Asimismo, cuando se post-irradió el ensayo con la mezcla de Fulereno ( $C_{60}$ ) y Cobre, se observó un ligero incremento de 129 a 134 saltos/minuto y que además no hubo diferencias significativas con respecto al Control (**Gráfico N° 17**).



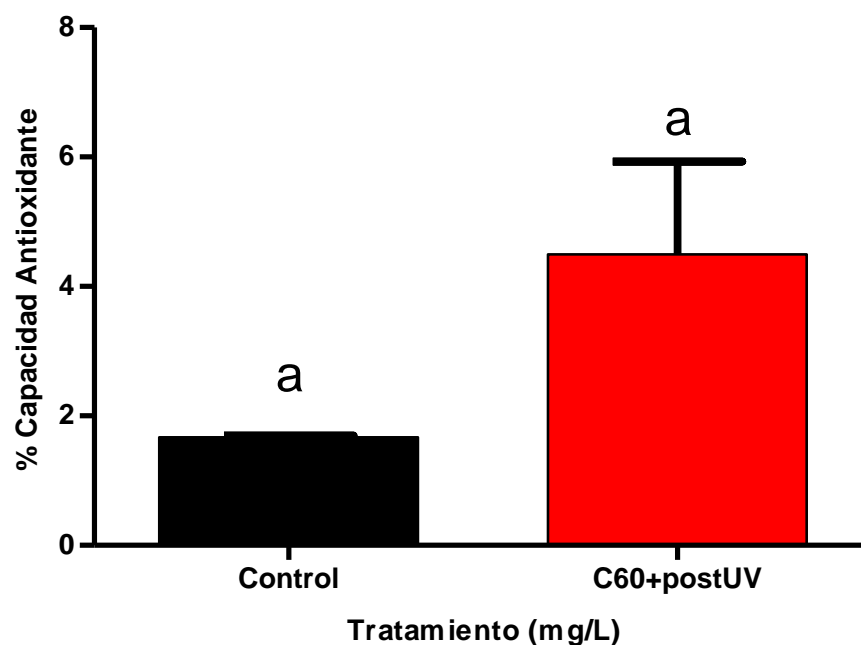
**Gráfico N° 16:** Frecuencia de saltos de *Daphnia magna* después de la exposición a Fulereno ( $C_{60}$ ) post-irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ).



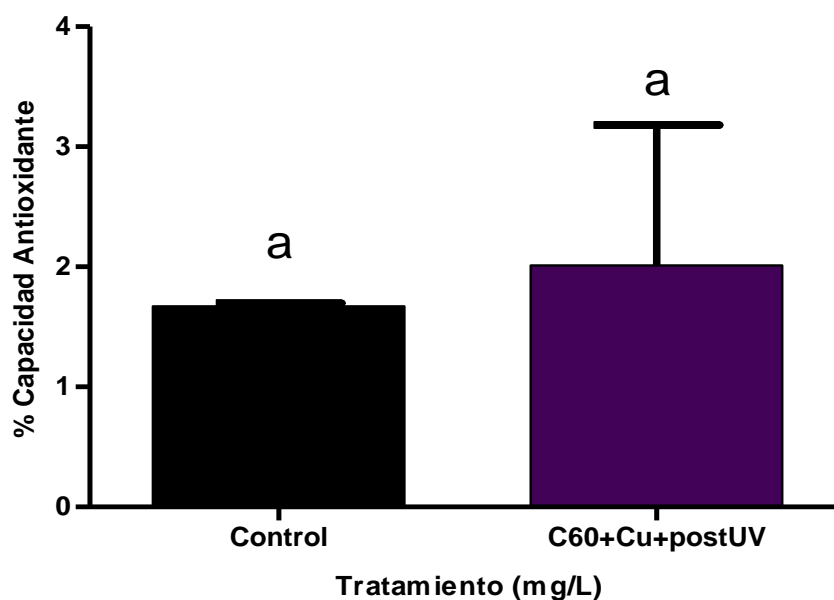
**Gráfico Nº 17:** Frecuencia de saltos de *Daphnia magna* después de la exposición a la mezcla de Fullereno ( $C_{60}$ ) y Cobre post-irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras similares indican ausencia de diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

Para el caso de la Capacidad antioxidante considerando sólo el Fullereno ( $C_{60}$ ) post-irradiado con luz UV, hubo un incremento del 3% sobre el grupo control, como lo muestra el **Gráfico Nº 18**, no encontrándose diferencias significativas entre ambos tratamientos.

Para el ensayo de la mezcla de Fullereno ( $C_{60}$ ) y Cobre con luz UV-Vis posteriormente irradiada, se vio un incremento de alrededor de 0.5% de la capacidad antioxidante con respecto al grupo control (**Gráfico Nº 19**). Tampoco se encontraron diferencias significativas.



**Gráfico N° 18:** Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de *Daphnia magna* después de la exposición a Fulereo ( $C_{60}$ ) post-irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras similares indican ausencia de diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

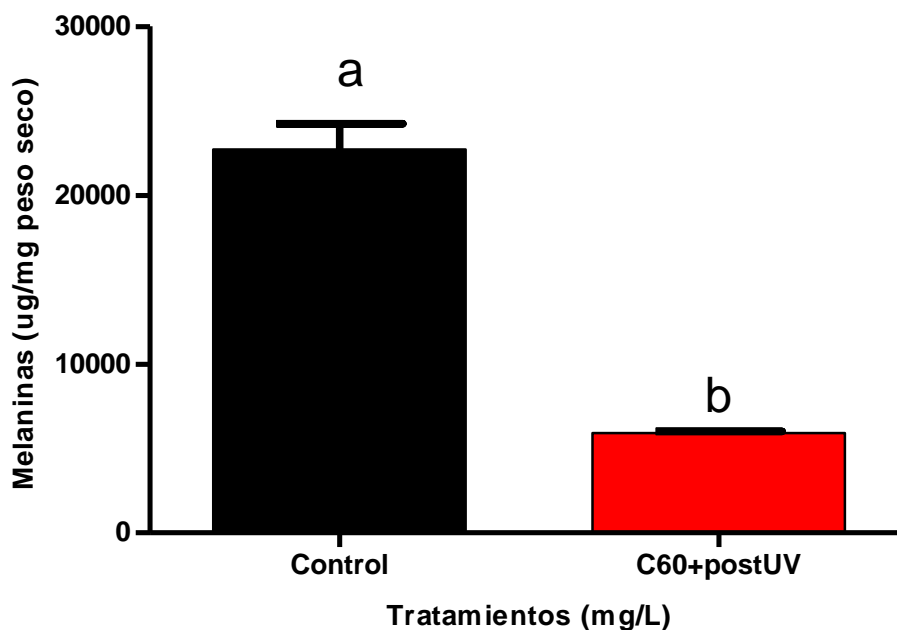


**Gráfico N° 19:** Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de *Daphnia magna* después de la exposición a la mezcla de Fulereo ( $C_{60}$ ) y Cobre post-irradiados con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras similares indican ausencia de diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

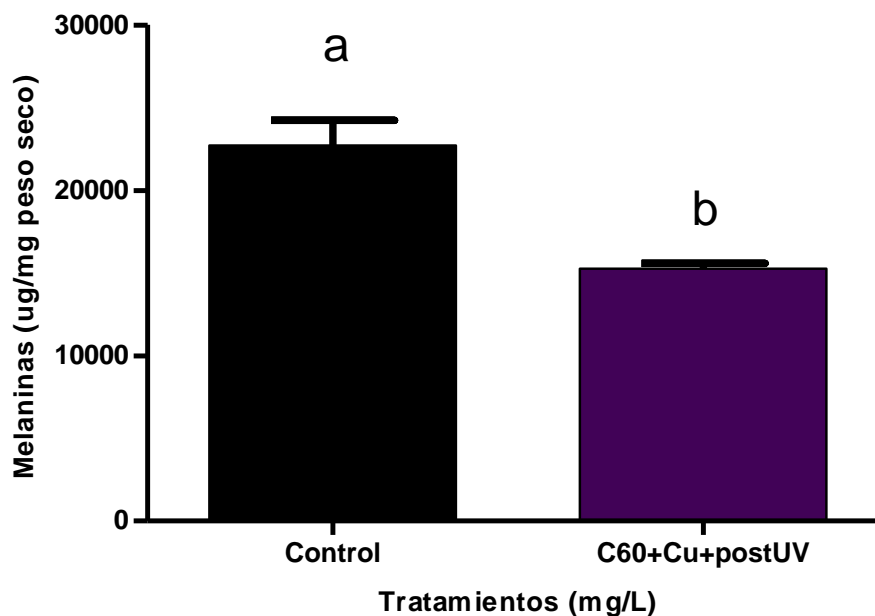
En cuanto a las melaninas halladas en los tratamientos de Fulereo ( $C_{60}$ ) y la mezcla Fulereo ( $C_{60}$ ) y Cobre post-irradiados con luz UV-Vis, ambos



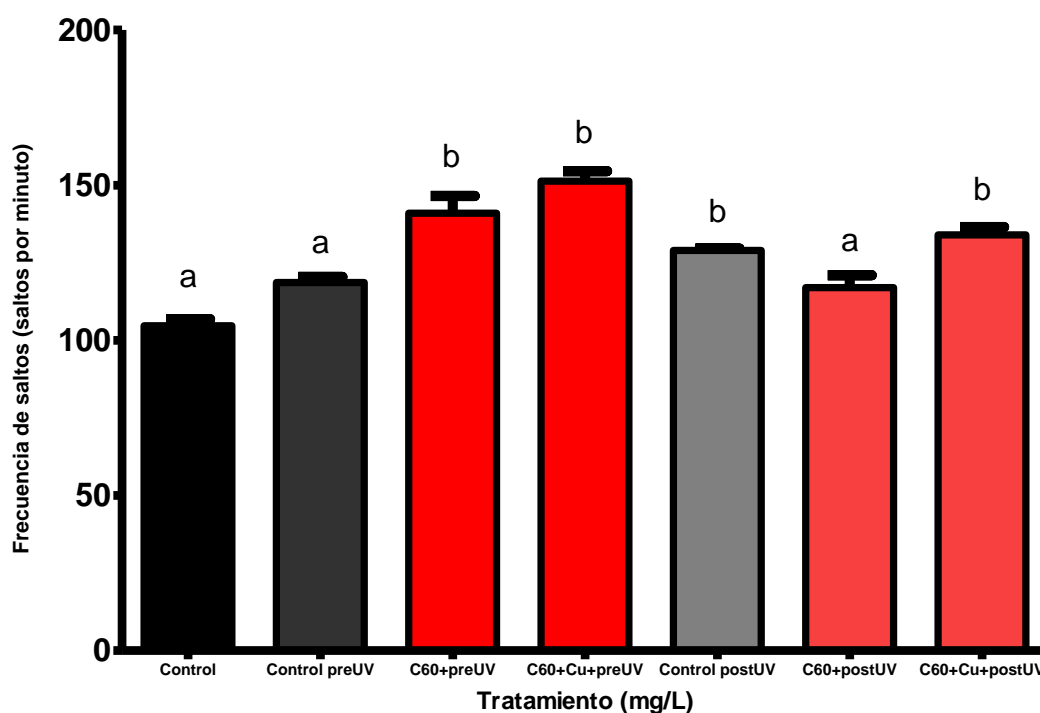
obtuvieron una disminución respecto al grupo control. En el primer caso, la disminución fue de un 75% (**Gráfico N° 20**), mientras que en el segundo, la cantidad de Melaninas disminuyó en un 25% (**Gráfico N° 21**). Además, en ambos casos no se encontraron diferencias estadísticas significativas.



**Gráfico N° 20:** Cantidad total de Melaninas (ug/mg peso seco) en *Daphnia magna* después de la exposición a Fullereno ( $C_{60}$ ) post-irradiado con luz UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).



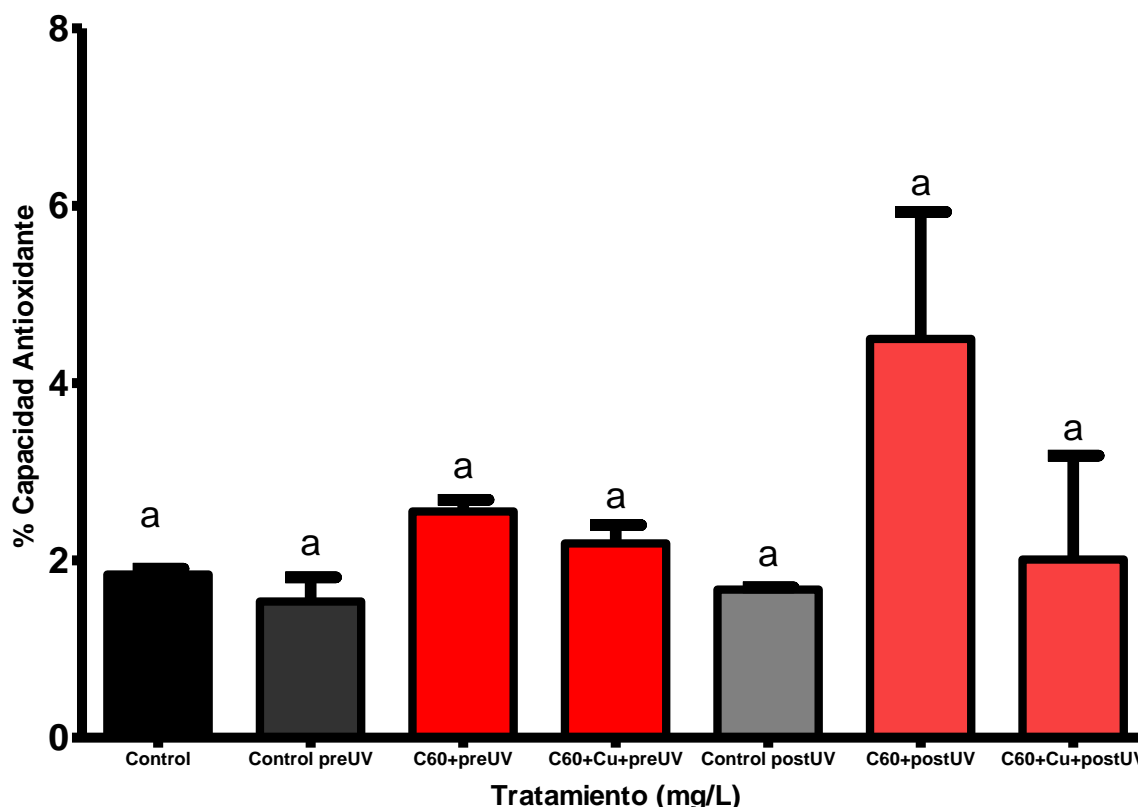
**Gráfico Nº 21:** Cantidad total de Melaninas (ug/mg peso seco) en *Daphnia magna* después de la exposición a la mezcla de Fullerenos (C<sub>60</sub>) y Cobre previamente irradiado. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).



**Gráfico Nº 22:** Número de Saltos de *Daphnia magna* después de todos los tratamientos ensayados de pre y post radiación UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).

En el **Gráfico N° 22** se muestra una comparación de todos los tratamientos pre y post irradiación con UV tanto para el Fulereo ( $C_{60}$ ) sólo así como la mezcla con Cobre incluyéndose sus respectivos grupos control para cada uno en cuanto a Frecuencia de Saltos (Saltos/minuto). En dichos tratamientos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el ensayo de pre y post irradiación tanto de Fulereo ( $C_{60}$ ); y entre la mezcla Cobre y Fulereo ( $C_{60}$ ).

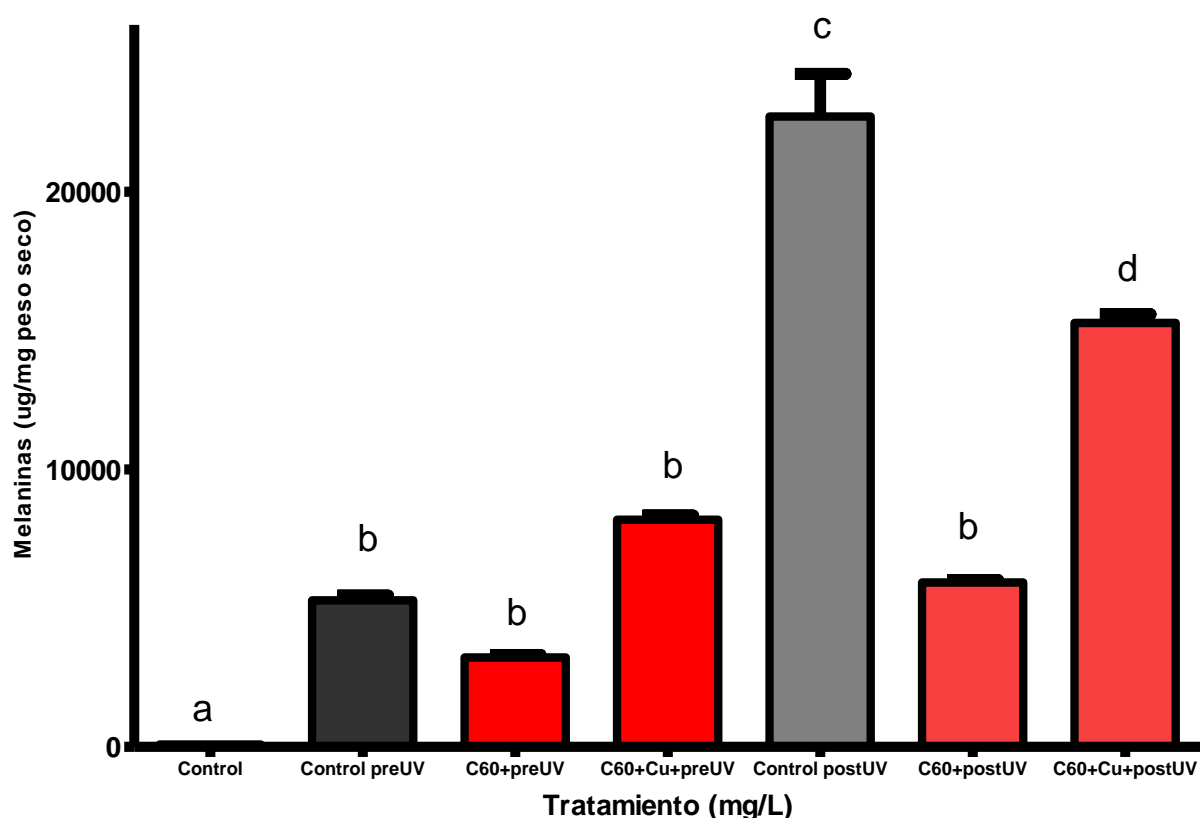
Asimismo, en el **Gráfico N° 23** también se hizo una comparación entre todos los tratamientos pre y post irradiación con UV tanto para el Fulereo ( $C_{60}$ ) así como la mezcla con Cobre incluyéndose sus respectivos grupos control para cada uno en cuanto a Capacidad Antioxidante (%), donde se puede apreciar que a nivel de estos ya existen diferencias debido a que el porcentaje de capacidad antioxidante tiene una ligera disminución en los tratamiento de pre y post radiación. Se observa además que para los casos de pre y post irradiación a luz UV-Vis donde sólo se usa Fulereo ( $C_{60}$ ) hay una mayor capacidad antioxidante en el segundo tipo de tratamiento, superando al control post UV en casi 3% del parámetro. Por otro lado, la mezcla del Fulereo ( $C_{60}$ ) y el Cobre refleja un resultado similar de alrededor del 2% tanto en pre como en post radiación UV-Vis; y en ambos casos se superó el porcentaje de sus respectivos grupos control. En los resultados de la mezcla también se ven diferencias entre el grupo control que no recibió exposición a luz UV-Vis con aquellos que sí fueron sometidos a dicha luz, cuyo valor refleja un mayor porcentaje de capacidad antioxidante con respecto a estos tratamientos con luz UV-Vis. En esta comparación entre todos los tratamientos pre y post radiación para capacidad antioxidante no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p>0.05$ ).



**Gráfico Nº 23:** Capacidad Antioxidante Total (% de captación de radicales) de *Daphnia magna* después de todos los tratamientos ensayados de pre y post radiación UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras similares indican ausencia de diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ).

También se hizo una gráfica comparativa (**Gráfico Nº 24**) para la cantidad de Melaninas de todos los pre y post irradiación tanto para el Fulereno ( $C_{60}$ ) como para la mezcla Fulereno ( $C_{60}$ ) y Cobre con sus respectivos grupos control. Comenzando con los grupos control, hubo diferencias entre el control sin luz UV-V-Vis con los dos que presentaban irradiación, observándose una gran cantidad de melaninas en el control post irradiado. Entre los tres grupos control (con y sin exposición a UV) se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ). Para los tratamientos donde sólo se usó Fulereno ( $C_{60}$ ), hubo disminución de melaninas en ambos tipos de tratamiento (pre y post exposición UV-Vis) respecto a sus grupos control; además de no encontrarse diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ). En el caso de los tratamientos donde se usó la mezcla de Fulereno ( $C_{60}$ ) y Cobre, aquel sin luz UV-Vis generó

menos melaninas que aquellos donde sí hubo irradiación. Y con respecto a los tratamientos de las mezclas irradiadas con luz UV-Vis, hubo una mayor generación de melaninas en el que hubo post-radiación. Además hay que agregar que la mezcla pre-radiación aumentó su producción de melaninas, mientras que en el caso de la mezcla post-radiación hubo una disminución de las mismas, ambos casos con respecto al grupo control. En ambos casos, hubo diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ). No se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) entre el grupo control sin exposición a luz UV, el grupo control post UV, el fullereno post UV y la mezcla fullereno más cobre post UV.



**Gráfico Nº 24:** Cantidad de Melaninas producidas en *Daphnia magna* después de todos los tratamientos ensayados de pre y post radiación UV-Vis. Los datos están expresados con un error estándar de la media de +1. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).

## VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 6.1 COMPORTAMIENTO DE *Daphnia magna* ANTE LA EXPOSICIÓN DE FULERENO C<sub>60</sub>

Como se muestra en la **Tabla Nº 2** y la **Tabla Nº 3**, el Fullereno C<sub>60</sub> y el Cobre, pueden inducir a efectos deletéreos en *Daphnia magna*, incluyendo mortalidad, afección en el comportamiento natatorio, alterando los movimientos de sus apéndices, incrementando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la disminución en la replicación del ADN.

Con lo mencionado en el párrafo anterior y a través de estudios previos (Miner BE, Kerr B. 2002), se ha llegado a inferir que los efectos negativos que originan ambos compuestos afectan directamente los mecanismos de huida frente a depredadores de *Daphnia magna*, ya sea incrementando el número de saltos o disminuyéndolos hasta la muerte.

En la primera fase de la experimentación, se sometieron diferentes concentraciones de Fullereno C<sub>60</sub> y Cobre, mostrando afectación sobre el nado de *Daphnia magna*. Para el caso de Cobre, los resultados en frecuencia de saltos, denotan que hay un pico donde las dafnias presentan un incremento de dicha frecuencia para luego descender desde la concentración 0.12 mg/L. Asimismo, para el caso de Fullereno C<sub>60</sub>, existe un ligero incremento en la frecuencia de saltos entre las concentraciones 0.5 y 1 mg/L para luego disminuir la emisión de saltos, hasta sólo mover los apéndices sin conseguir saltar. Sin embargo, sucede algo peculiar cuando se mezclan ambos componentes (Fullereno C<sub>60</sub> y Cobre), ya que se observa una disminución en la frecuencia de saltos, lo cual se asemeja a lo hallado por Khangarot (2003) para Cobre luego de 48 horas. El

papel de transportador del Fullereno C<sub>60</sub> puede estar jugando un rol en la absorción del Cobre, ocasionando que, en comparación de lo hallado en el tratamiento con Cobre en unitario, la frecuencia de saltos disminuya en lugar de aumentar.

En la segunda fase de la experimentación, *Daphnia magna* fue sometida a la radiación UV en tratamientos de pre y post exposición. Se buscaba determinar cómo reaccionaba el organismo ante el estrés ambiental del Fullereno C<sub>60</sub>, el Cobre y la radiación UV. Cuando se comparan con la muestra blanco (sin ningún compuesto o exposición a luz UV), se denota un aumento en la frecuencia de saltos en todos los tratamientos expuestos a radiación, con lo cual se deduce que sí existe afectación negativa a causa de la luz UV, siendo más notoria en la pre-exposición. En esta última, la frecuencia de saltos aumenta significativamente cuando se adiciona Cobre, lo que indica un papel aditivo en el comportamiento de *D. magna* y cómo su efecto es mayor cuando actúan a la vez. Estos resultados se contrastan con lo hallado para post exposición a UV, donde la frecuencia de saltos es menor comparándolo con el tratamiento de pre-exposición. Esto refleja que cuando el Fullereno C<sub>60</sub> actúa sólo previamente, la posterior incidencia de luz UV no afecta de manera significativa el comportamiento de *D. magna*; mientras que cuando es mezclado con Cobre hay un efecto aditivo, produciéndose un incremento en la frecuencia de saltos. Todos estos resultados afirman lo dicho por Häder (2003) y Sinha (2002) en sus investigaciones, donde demuestran que la radiación UV es capaz de afectar negativamente la actividad, el desarrollo y la supervivencia de los organismos acuáticos. Además se confirma lo dicho por Leech y Williamson (2001) sobre la baja tolerancia de los cladóceros a la radiación UV.

La afectación a la frecuencia de saltos de *Daphnia magna* producto del ingreso de contaminantes como el Fullereno C<sub>60</sub>, Cobre y radiación UV, tiene un efecto bastante perjudicial en su ciclo de vida, debido a que incide en sus comportamientos a nivel de

migración vertical (Pieters *et al.* 2005; Rhode *et al.*, 2001) para alimentarse, huida de predadores, camuflaje, entre otros; sugiriendo que las estrategias para lidiar con la radiación UV son los más afectados. Particularmente, los saltos representan una respuesta de evasión y escape para las dafnias, cuando estas son expuestas a los depredadores (Miner BE, Kerr B. 2002). Sin embargo, la tasa de incremento de saltos pueden causar que las dafnias sean más visibles para sus depredadores, causando por tanto el aumento de las tasas de predación (Baun A. *et al.* 2008; Hansson LA. 2000). Estos efectos han sido descritos por Lovern *et al.* (2007), donde las concentraciones subletales de  $C_{60}$  y  $C_{60}HxC_{70}Hx$  aumentan la frecuencia de saltos.

## **6.2 EL $DL_{50}$ Y $EC_{50}$ COMO CRITERIOS ECOTOXICOLÓGICOS EN *Daphnia magna***

La  $EC_{50}$  se refiere a la concentración de una sustancia, en este caso Fulereo  $C_{60}$ , en un medio que se espera produzca un cierto efecto en el 50% de los organismos testeados. Mientras que en el caso de la  $DL_{50}$ , es la dosis de una sustancia que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba, que para este caso sería *Daphnia magna*.

La  $EC_{50}$  hallada, luego de someter a *Daphnia magna* a diferentes concentraciones de Fulereo  $C_{60}$ , fue de 4mg/L. Esto supone que para este experimento, dicha concentración es la que genera efectos significativos en el organismo. De acuerdo a Manzetti *et al* (2013), los Fulerenos están siendo ampliamente estudiados en los últimos años debido a sus aspectos adversos a la salud, ya que han demostrado interferencia con el normal funcionamiento de muchos mecanismos en el cuerpo de animales y seres humanos. Por tanto, de acuerdo a los resultados encontrados en este trabajo, se necesitaría una concentración de 4mg/L para incurrir en efectos



perjudiciales en el organismo de *D. magna*, afectando su comportamiento y forma de desarrollo.

Para el caso de la DL<sub>50</sub> hallado para fulereno C<sub>60</sub> en *Daphnia magna* para el presente trabajo, se observa un contraste con los trabajos de Oberdörster *et al* (2004) y Lovern & Klaper (2006) los cuales obtuvieron valores más bajos de dicho indicador con valores de 0.8 ppm y 0.46 ppm, respectivamente, mientras que en este trabajo se obtuvo un valor de 4.8 ppm. Esto podría ser debido a que dichos investigadores usaron solventes con antecedentes tóxicos como el THF (Tetrahidrofurano). Sin embargo, al compararse este último valor con el conseguido por Jingyuan *et al* (2007), con un valor de 10 ppm; el valor obtenido en este experimento se ubica por debajo. Por tanto, existe un ligero contraste entre los resultados si se considera la presentación del Fulereno C<sub>60</sub>, ya que las dos primeras referencias utilizaron fulerenos coloidales dándoles resultados más bajos y por ende existe una mayor toxicidad, mientras que la última referencia utilizó una forma descubierta de dicho compuesto.

### **6.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL COMO MEDIDA INDIRECTA DE ESTRÉS OXIDATIVO.**

Según lo dicho previamente por diversos investigadores (Bradshaw and Hardwick 1989, Calow 1989; Oberdoster 2004, Oberdoster 2006, Lovern y Kapler 2006) el Fulereno C<sub>60</sub> es generador de estrés para los organismos de *Daphnia magna*, y constituye un riesgo potencial desde el punto de vista ecotoxicológico, por lo que se evaluó la capacidad antioxidante, como respuesta a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los organismos, producto de dicho estrés. Los resultados muestran que sí existe una producción de ROS en todos los tratamientos a los que los organismos fueron sometidos, evidenciándose un mayor estrés en los

tratamientos de 0.12; 0.25; 0.5 y 4 mg/L. Considerando que se usó Fulereno C<sub>60</sub> descubierto y además sin solventes perjudiciales, se puede afirmar que dicho compuesto por sí solo es capaz de originar estrés oxidativo en los organismos pero en un grado de baja toxicidad (Henry *et al.*, 2011). Esto incluso se ve cuando se agrega Cobre, lo cual no produce un efecto aditivo en la capacidad antioxidante. Lo hallado se contrasta con los resultados obtenidos por Oberdörster *et al.* (2004) cuando sometió a un pez (*Micropterus salmonoides*) a 0.5 ppm de Fulereno C<sub>60</sub> con agua, mostrando un daño celular en el tejido cerebral 17 veces superior, 48 horas después, producto de un estrés oxidativo. Esto significa, que lo dicho por Henry *et al.* (2011) sobre la baja toxicidad del Fulereno C<sub>60</sub> y que los resultados de los estudios realizados inicialmente por ciertos investigadores serían producto de impurezas en la muestra y falla de los artefactos experimentales; podrían ser ciertos y que el Fulereno C<sub>60</sub> no causaría un efecto tan letal como lo previamente encontrado.

Para el caso del Cobre, estudios realizados por Ríos de Molina *et al.* (2008) muestran la toxicidad de este en *Daphnia magna* cuando el tiempo de exposición se incrementa. Metales tales como el cobre, son capaces de hacer ciclos redox en los que un solo electrón puede ser aceptado o donado por el metal. Esta acción cataliza reacciones que producen radicales y puede producir especies reactivas del oxígeno. La mayoría de las enzimas que producen las especies reactivas del oxígeno contienen metales como el Cobre. La presencia de este en los sistemas biológicos de forma no complejada (no en una proteína u otro tipo de protección del complejo metálico) puede aumentar significativamente el nivel de estrés oxidativo. Es así que cuando se midió la capacidad antioxidante en los diferentes tratamientos con Cobre, hubo un pico en la concentración 0.025 mg/L, de la cual no hubo un descenso significativo en los tratamientos siguientes. En la prueba de Fulereno C<sub>60</sub> con Cobre, se mostró que la capacidad antioxidante resultante fue menor a las obtenidas cuando se sometió a *Daphnia magna* a los diferentes tratamientos con Fulereno C<sub>60</sub>. Reafirmandose de

alguna forma, lo dicho por Ríos de Molina *et al.* (2008) al decir que la toxicidad de Cobre queda reducida al interactuar con otros contaminantes.

Sin embargo, los resultados encontrados en los ensayos de pre y post exposición a radiación UV no mostraron diferencias estadísticamente significativas, teniendo como referencia la muestra blanco. Esto indicaría que a pesar que se adicione un metal como el Cobre y la exposición de la radiación UV, no habrá un efecto aditivo o sinérgico significativo en cuanto a la generación de estrés oxidativo.

#### **6.4 PRODUCCIÓN DE MELANINAS COMO RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN DE FULERENO C<sub>60</sub> Y COBRE A DIFERENTES CONCENTRACIONES BAJO LA INFLUENCIA DE LUZ UV-VIS.**

Para evitar el daño por UV, las especies zooplanctónicas usan diferentes estrategias, lo cual incluye cambios en el fenotipo, tal como el incremento de los pigmentos fotoprotectores y la capacidad de huida frente a depredadores.

El estudio de Miner y Kerr (2002) mostraron que las poblaciones melánicas de *Daphnia* manifestaron una clara evidencia de adaptación a las condiciones locales de UV. Ellos consideraron dos situaciones diferentes: las dafnias que provienen de fuentes de agua con gran transparencia fueron más tolerantes al UV en condiciones de laboratorio que aquellas poblaciones provenientes de fuentes con baja transparencia. Este patrón selectivo fue el esperado debido a que el UV es un potente factor de estrés que daña el ADN en los tejidos vivos. Es más, las radiaciones UV son conocidas por tener amplios efectos en los ecosistemas acuáticos, incluyendo la fotoexcitación de compuestos tóxicos, mutagénesis y estrés fisiológico (Tada *et al.* 2010; Azad, 2007).

Primero, se midió la concentración de los pigmentos de Melanina del exoesqueleto de la *Daphnia*, una variable considerada por ser dependiente de la exposición de radiación UV. En los resultados obtenidos para Fulereno C<sub>60</sub> y Cobre (Prueba para determinar EC<sub>50</sub> y DL<sub>50</sub>) se mostró un aumento de la producción de melaninas en ambos casos, sugiriendo que ambos compuestos, fomentan la generación de las mismas. Si la síntesis del pigmento requiere energía, es posible que la más baja estimación energética deba imponer restricciones en el crecimiento, reproducción o las reacciones de la demanda de ATP para la síntesis antioxidante, como la reducción del glutatión. Además, las formas pigmentadas son más vulnerables para ser vistas por los predadores que aquellos que no son pigmentadas (Hansson *et al.* 2007). En consecuencia, se espera una compensación entre los costos de pigmentación y las amenazas por radiación UV y predación (Hansson *et al.* 2007).

Al mismo tiempo, estudios como los de Kamat *et al.* (2000) muestran claramente que el Fulereno es una molécula fotoexcitable con luz visible y UV. No obstante, algunas consecuencias ecológicas de que las dafnias sean pigmentadas (altos riesgos de predación) pueden al final, mejorar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido al fulereno. Esto se evidencia con los resultados obtenidos en los tratamientos de pre y post exposición a luz UV. Además de que la concentración de melaninas fue mayor en los tratamientos de la mezcla de ambos compuestos tanto en pre como post radiación. Se puede considerar, por ejemplo, que el radical Hidroxilo o el singlete de Oxígeno producidos por el Fulereno al ser excitado por la luz visible o la UV (Kamat *et al.* 2000), debe ser mayor en un organismo transparente que en uno más oscuro. Esta idea puede ser reforzada por el hecho de que Tada (2010) demostró que la melanina actúa como un captador del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), sugiriendo que los más altos niveles de melanina deben ser adaptados bajo escenarios pro oxidantes durante la exposición a Cobre o C<sub>60</sub>. El hecho de que la exposición a UV induzca,

como se había esperado, un aumento de los niveles de melanina en *D. magna* fue modulada por la exposición a las combinaciones de Cobre y Fullereno, lo cual disminuyó dramáticamente el contenido de melanina, sugiriendo que la adaptación a la radiación UV pueda estar incompleta. Se necesitan más estudios para verificar si junto con la conocida relación entre UV y síntesis de melanina, existe una vía secundaria que lleva a la inducción de melanina después de la exposición a Cobre y Fullereno. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, la combinación de Cobre y Fullereno dañaron las respuestas primarias, al nivel de los inductores de la vía secundaria postulada.

En resumen, los resultados obtenidos de este estudio indican que el Fullereno o el cobre son moduladores de la concentración de melanina en *D. magna*, aunque se postulan dos mecanismos diferentes, ya que los niveles más altos observados después de la exposición a ambas moléculas son contrarias a la inhibición de la producción de melanina bajo exposición a rayos UV, una condición que debe reflejar una condición ambientalmente más realista.

## VII. CONCLUSIONES

- El Fulereno causa efectos a nivel comportamental y de respuesta fisiológica sobre *Daphnia magna* luego de someterla a diferentes concentraciones del compuesto. Siendo la concentración tóxica a nivel de  $EC_{50}$  de 4 mg/L y para  $DL_{50}$  de 4.8 mg/L.
- El Cobre afecta a nivel comportamental y de respuesta fisiológica sobre *Daphnia magna* a diferentes concentraciones, obteniéndose un  $EC_{50}$  de 0.5 mg/L y  $DL_{50}$  de 0.21 mg/L mostrando que este metal suscita respuestas de organismos como *Daphnia magna* a relativamente bajas concentraciones.
- La exposición a Cobre altera la capacidad antioxidante total con respecto al Fulereno  $C_{60}$ , sin embargo no se puede afirmar que el grado de toxicidad sea mayor en uno o en otro; ya que pueden estar involucradas otras rutas de expresión para contrarrestar el efecto tóxico.
- La exposición a Fulereno  $C_{60}$  y Cu de manera independiente genera una alta concentración de melaninas, dejando evidencia de que existe una afectación a nivel fisiológico en los mecanismos de respuesta a depredadores propios de *Daphnia magna*.
- El Fulereno  $C_{60}$  en interacción con el Cobre mostró un menor grado de afectación a nivel fisiológico (capacidad antioxidante) en *Daphnia magna* en comparación cuando el Fulereno se usa de manera independiente.
- La frecuencia de saltos de *Daphnia magna* ante la exposición de Fulereno  $C_{60}$  y Cobre a diferentes concentraciones y bajo la influencia de luz UV-VIS, resulta afectada incrementando su frecuencia, lo cual podría incidir negativamente en el comportamiento de defensa frente a depredadores por parte de esta especie, entorpeciendo su sistema de huida.

- Los tratamientos de pre y post exposición a radiación UV de Fullereno C<sub>60</sub> y Cobre en *Daphnia magna*, no muestran diferencias significativas en la capacidad antioxidante total de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en comparación con los tratamiento sin luz UV que sí mostraron diferencias. Esto puede indicar que la interacción de estos tres componentes (Fullereno, Cobre y luz UV) no resultaría en una grave afectación sobre organismos como *Daphnia magna*.
- La pre y post radiación UV a Cobre y Fullereno C<sub>60</sub> en *Daphnia magna*, genera una alteración de nivel fisiológico relacionado con los mecanismos de defensa frente a depredadores y luz UV a través de la pigmentación (melaninas); y que si dichos organismos se exponen a compuestos como los utilizados pueden ser fácilmente capturados y/o afectados por la luz UV.
- De manera general, se concluye que la exposición de *Daphnia magna* a Fullereno durante un tiempo de 48 horas, causa alteraciones a nivel fisiológico y comportamental, pero no se ha establecido que los efectos observados tengan un carácter permanente en el organismo de dicho individuo, o que más aún, sean activados mecanismos que puedan contrarrestar el impacto de compuestos tales como el Fullereno y el Cobre y factores como la luz UV.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas similares que consideren el comportamiento de *Daphnia magna* a diferentes tiempos de tratamiento como 24, 48, 72 y 96 horas; y de esta manera evaluar los cambios que experimenta de manera visible.
- Ensayar los tratamientos realizados de pre y post exposición de radiación UV a concentraciones más altas de Fulereo y Cobre en *Daphnia magna* para determinar si existe variaciones significativas en la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).
- Incluir pruebas que evalúen la capacidad de depuración de *Daphnia magna* en presencia de Fulereo (C<sub>60</sub>) para comprobar si existe bioacumulación de dicho compuesto.



## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATIENZAR F., CHEUNG V., JHA A. & DEPLEDGE M. Fitness Parameters and DNA Effects Are Sensitive Indicators of Copper-Induced Toxicity in *Daphnia magna*. Toxicological Sciences. 2000. Volume 59, Issue 2Pp. 241-250

AVANASI, R., JACKSON, W. A., SHERWIN, B., MUDGE, J. F., & ANDERSON, T. C<sub>60</sub> fullerene soil sorption, biodegradation, and plant uptake. Environmental science & technology. 2014.

AYERS R. & WESTCOT D. Water quality for Agriculture. 1985. F.A.O. paper 29, 174 pp.

AZAD M. Comparative sensitivities of the tropical cladoceran, *Ceriodaphnia rigaudii* and the temperate species *Daphnia magna* to seven toxicants. Toxicological & Environmental Chemistry. 2007. 89:2, pp 347-352.

BARATA C., BAIRD D., NOGUEIRA A., SOARES A., RIVA M. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides of *Daphnia magna* Straus. Implications for mult-substance risks assessment. Aquatic Toxicology. 2006. 78: 1-14.

BAUDO R. Ecotoxicological testing with *Daphnia*. Mem. Ist. Ital Idrobiol., 1987. 45: 461-482.

BAUN A, SØRENSEN S, RASMUSSEN R, HARTMANN N, KOCH C. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C<sub>60</sub>. *Aquat Toxicol* 2008. 86:379–387.

BIESINGER, K. & CHRISTENSEN G. Effects of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna*. Journal of Fisheries Research Board of Canada 29. 1972. 1691-1700 pp.

BORM. *Particle and Fibre Toxicology* 3:11. 2006. Doi: 10.1186/1743-8977-3-11

CAIRNS, J. & DICKSON K. Field and Laboratory protocols for evaluating the effects of chemical substances on aquatic life. *Journal of testing and evaluation*. 1978. Vol 6, N° 2. 81-90 pp.

CATTANEO A., GORNATI R., CHIRIVA. Nanomaterials: the role of invertebrate testing. 2009. Department of Biotechnology and Molecular Sciences (DBMS), University of Insubria.

CLEMENTE, A. R., ARRIETA, C., LENIN, E., & PEÑUELA MESA, G. A. Wastewater treatment processes for the removal of emerging organic pollutants. *Revista Ambiente & Água*, 8(3). 2013. Pp 93-103.

CONDE-PORCUNA, J.M., RAMOS-RODRÍGUEZ, E. Y PÉREZ-MARTÍNEZ, C. Correlations between nutrient limitation and zooplankton populations in a mesotrophic reservoir. *Freshwater Biology* 47. 2002. Pp 1463-1473.

COWGILL, U. & MILAZO, P. Comparison of the effects of Metallic Copper and Copper Nitrate on *Cerio daphnia dubia* utilizing the three-brood test. *Bull. Environ. Contam. toxicol.* 46. 1991. Pp 141-145.

DA ROS T. Twenty years of promises: Fullerene in medicinal chemistry. *Medicinal chemistry and Pharmacological potential of Fullerenes and Carbon nanotubes – Carbon Materials. Chemistry and Physics*. 2008. pp 1-21.

DAL FORNO, G. O., KIST, L. W., DE AZEVEDO, M. B., FRITSCH, R. S., PEREIRA, T. C. B., BRITTO, R. S., ... & BOGO, M. R. Intraperitoneal Exposure to Nano/Microparticles of Fullerene () Increases Acetylcholinesterase Activity and Lipid Peroxidation in Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Brain. *BioMed research international*, 2013.

DAUGHTON C., TERNES T. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect.* 107. 1999. Pp 907–938.

DE SCHAMPHELAERE C. & JANSSEN C. Effects of dissolved organic carbon concentration and source, pH, and water hardness on chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(5). 2004. Pp 1115-1122.

DERFUS A., CHAN W, BHATIA S. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters*. 4. 2004. Pp 11–18. doi: 10.1021/nl0347334. Ref Type: Generic.

ESTÁNDARES DE CALIDAD AMBIENTAL DE AGUA - Grupo N° 3: Riego de Vegetales y Bebidas de Animales – DIGESA

EVANS, M. S. & D. MC NAUGHT. The effect of toxic substances on zooplankton populations: a great lake perspective in Toxic contaminants and ecosystem health. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* 2. 1988. Pp 151:163.

FERRANDO M. & ANDREU E. Feeding behavior as an index of copper stress in *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus*. *Comparative biochemistry and physiology part C* 106 (2). 1993. Pp 327-331.

FLEMING, C. & TREVORS J. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air and Soil Pollution* 44. 1989. Pp 143-158.

FORTNER J., LYON D., SAYES C., BOYD A., FALKNER J., HOTZE E., ALEMANY L., TAO Y., GUO W., AUSMAN K., COLVIN L., HUGHES J. C<sub>60</sub> in water: Nanocrystal formation and microbial response. *Environ Sci Technol* 39. 2005. Pp 4307–4316.

GAETE H. y PAREDES K. Toxicidad de mezclas de contaminantes químicos sobre el Cladóceros *Daphnia magna*. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 12(1). 1996. Pp 23-28.

GAETE H., CHÁVEZ C. Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (Cladocera, Crustacea), Limnetica, 27 (1). 2008. Pp 1-10.

GARCÍA-PICHEL F. Y CASTENHOLTZ R. Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Applied Environmental Microbiology* 59. 1993. Pp 163– 169.

GHARBI, N., PRESSAC, M., HADCHOUEL, M., SZWARC, H., WILSON, S., MOUSSA, F. C(60)fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nanoletters* 5. 2005. Pp 2578–2585.

GOTTSCHALK F, SONDERER T, SCHOLZ R, NOWACK B. Modelled environmental concentrations of manufactured nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environ Sci Technol* 43. 2009. Pp 9216–9222.

HÄDER D. Effects of solar ultraviolet radiation on aquatic primary producers in *Handbook of Photochemistry and Photobiology: Photobiology*. 2003. vol. 4, ed. H. S. Nalwa, American Scientific Publishers, California, USA, pp. 329–352.

HÄDER D. UV-B impact on the life of aquatic plants in *Modern Trends in Applied Aquatic Ecology*. 2003. Ed. R. S. Ambasht and N. K. Ambasht, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 149–172.

HANSSON L. Induced pigmentation in zooplankton: a trade-off between threats from predation and ultraviolet radiation. *Proc Royal Soc Lond B* 267. 2000. Pp 2327-2331.

HANSSON L., HYLANDER S., SOMMARUGA R. Escape from UV threats in zooplankton: a cocktail of behavior and protective pigmentation. *Ecology* 88. 2007. Pp 1932–1939.

HENRY T., MENN F., FLEMING J., WILGUS J., COMPTON R., SAYLER G. Attributing effects of aqueous C<sub>60</sub> nano-aggregates to tetrahydrofuran decomposition products in

larval zebrafish by assessment of gene expression. *Environ. Health Perspect* 115. 2007. Pp 1059-1065.

HENRY, T. B., PETERSEN, E. J., & COMPTON, R. N. Aqueous fullerene aggregates generate minimal reactive oxygen species and are of low toxicity in fish: a revision of previous reports. *Current opinion in biotechnology*, 2011. 22(4), pp 533-537.

HOBBS, R. Y NORTON D. Towards a conceptual framework for restoration ecology. *Restoration Ecology* 4. 1996. Pp 93-110.

JEFFREY W., PLEDGER R., AAS P., HAGER S., COFFIN R., VON HAVEN R. Y MITCHELL D. Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. *Marine Ecology Progress Series* 137. 1996. Pp 283 – 291.

JORGE, M. B., LORO, V. L., BIANCHINI, A., WOOD, C. M., & GILLIS, P. L. Mortality, bioaccumulation and physiological responses in juvenile freshwater mussels (< i> Lampsilis siliquoidea</i>) chronically exposed to copper. *Aquatic Toxicology* 126, 2013. Pp 137-147.

KAMAT J., DEVASAGAYAM T., PRIYADARSINI K., MOHAN H., MITTAL J. Oxidative damage induced by the fullerene C<sub>60</sub> on photosensitization in rat liver microsomes. *Chem. Biol. Interact.* 114. 1998. Pp 145–159.

KAMAT J., DEVASAGAYAM T., PROYADARSINI K., MOHAN H. Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivative and its possible biological implications. *Toxicology* 155. 2000. Pp 55-61.

KELLER, W. & YAN N. Recovery of crustacean zooplankton species richness in Sudbury Area Lakes following water quality improvements. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1991. Vol 48:1635-1644.

KEPLEY C. Fullerenes in Medicine; Will it ever Occur?. Journal of Nanomedicine & Nanotechnology. 2012.

KERLE E., JENKINS J. & VOGUE P. Understanding pesticide persistence and mobility for groundwater and surface water protection. Oregon State University. 1996. EM 8561.

KERRISON, P., ANNONI D., ZARINI S., RAVERA O. & MOSS B. Effects of low concentrations of heavy metals on plankton community dynamics in a small, shallow, fertile lake. Journal of Plankton Research. 1988. Vol. 10 N°4 779-812 pp.

KERSTING, K. 1984. Development and use of aquatic micro-ecosystem as a test system for toxic substances. Int. Revue ges Hydrobiol. 69:4 567-607 pp.

KHANGAROT B. & RATHORE R. Effects of Copper on Respiration, Reproduction, and Some Biochemical Parameters of Water Flea *Daphnia magna* Straus. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 70. 2003. Pp 112-117

KREUTER J., SHAMENKOV D., PETROV V., RAMGE P., CYCHUTEK K., KOCK-BRANDT C., ALYAUTDIN R. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle bound drugs across the blood–brain barrier. J. Drug Target. 10. 2002. Pp 317–325.

KROTO H., HEATH J., OBRIEN S., CURL R., SMALLEY R. C-60-Buckminsterfullerene. Nature 318. 1985. Pp 162–163.

LEE J., FORTNER, J., HUGHES, J., KIM, J. Photochemical production of reactive oxygen species by C<sub>60</sub> in aqueous phase during UV irradiation. Environ. Sci. Technol. 41. 2007. Pp 2529–2535.

LEECH D. & WILLIAMSON C. Is tolerance to UV radiation in zooplankton related to body size, taxon, or lake transparency? Ecological Applications, 10. 2000. Pp 1530–1540.

LEVI N., HANTGAN R., LIVELY M., CARROLL D., PRASAD G. C<sub>60</sub>-fullerenes: detection of intercellular photoluminescence and lack of cytotoxic effects. J. Nanobiotech. 4. 2006. Pp 14, doi: 10.1186/1477- 3155 – 4 – 14.

LIANG H., HE Y., YE Y., XU X., CHENG F., SUN W., SHAO X., WANG Y., LI J., WU K. Two-dimensional molecular porous networks constructed by surface assembling. *Coord Chem Rev* 253. 2009. Pp 2959–2979.

LITTLE, E. AND FABACHER, D. Comparative sensitivity of rainbow trout and two threatened salmonids, Apache trout and Lahontan cutthroat trout, to ultraviolet-B radiation. In: C.E.Williamson and H.E. Zagarese (eds.). Impact of UV-B Radiation on Pelagic Freshwater Ecosystems. Archiv für Hydrobiologie - Advances in Limnology, 43. 1994. Pp 217–226.

LOVERN S, RUDISTRICKLER J, KLAPER R. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nanoC<sub>60</sub>, and C<sub>60</sub>HxC<sub>70</sub>Hx). *Environ Sci Technol* 41. 2007. Pp 4465-4470.

LOVERN S. & KLAPER R. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C<sub>60</sub>) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem* 25. 2006. Pp 1132–1137.

MANDAL, S., & AHMED, A. T. A. Copper, Cadmium, Chromium and lead bioaccumulation in Stinging Catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) and freshwater mussel, *Lamellidens corrianus* Lia and to compare their concentration in sediments and water of Turag river. Journal of the Asiatic Society of Bangladesh, Science, 39(2). 2014. Pp 231-238.

MANZETTI S., BEHZADI, H., OTTO, A., & VAN DER SPOEL, D. Fullerenes toxicity and electronic properties. *Environmental Chemistry Letters*, 11(2). 2013. Pp 105-118.

MILARDOVIĆ S., IVEKOVIĆ D., GRABARIĆ B. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochem* 68. 2006. Pp 175-180.

MILLA M., KORHOLA A. UV-induced pigmentation in subarctic *Daphnia*. *Limnol Oceanogr* 47. 2002. Pp 295–299.

MILLA R., TARTAROTTI B. UV radiation and freshwater zooplankton: damage, protection and recovery. *Freshwater*. 2010. *Rev* 3:105–131.

MINER B., KERR B. Adaptation to local ultraviolet radiation conditions among neighbouring *Daphnia* populations. *Proc R Soc B*. 278. 2002. Pp 1306–1313.

MONTELLANO, A., DA ROS, T., BIANCO, A., & PRATO, M. Fullerene C<sub>60</sub> as a multifunctional system for drug and gene delivery. *Nanoscale*, 3(10). 2011. Pp 4035-4041.

MOSTAJIR B., DEMERS S., DE MORA C. BELZILE J., CHANUT P., GOSSELIN M., ROY S., VILLEGAS P., FAUCHOT J., BOUCHARD J., BIRD D., MONFORT P. AND LEVASSEUR M. Experimental test of the effect of ultraviolet-B radiation in a planktonic community. *Limnology and Oceanography*, 44. 1999. Pp 586–596.

NEBEKER A., CAIRNS M., ONJUKKA S., TITUS R. Effect of age on sensitivity of *Daphnia Magna* to cadmium, copper and cyanazine. *Environmental Toxicology and Chemistry* (impact factor: 2.81). 10/2009; 5(6):527 - 530.

OBERDORSTER E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C<sub>60</sub>) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect*. 2004. 112:1058–1062.

OBERDÖRSTER E. Los riesgos potenciales de los nanomateriales: un examen llevado a cabo para ECETOC BioMed Central Particle and Fibre Toxicology. 2006. 3: 11-11.



OBERDÖRSTER E., ZHU S., BLICKLEY M., MCCLELLAN-GREEN P., HAASCH M. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C<sub>60</sub>) on aquatic organisms. *Carbon*. 2006. 44:1112-1120.

OBERDÖRSTER G., STONE V., DONALDSON K. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Nanotoxicology*. 2007. 1:2-25.

PIETERS, B., Daphnid population response to pesticides. Proefschrift Universiteit van Amsterdam, FNWI, 2007. ISBN 978-90-76894-68-3.

PIETERS B., PASCHKE A., REYNALDI S., KRAAK M., ADMIRAAL W., LIESS M. Influence of food limitation on the effects of fenvalerate pulse exposure on the life-history and population growth rate of *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem*. 2005. 24:2254-2259.

RANCAN F., ROSAN S., BOEHM F., CANTRELL A., BRELLREICH M., SCHOENBERGER H. Cytotoxicity and photocytotoxicity of a dendritic C(60) mono-adduct and a malonic acid C(60) tris-adduct on Jurkat cells. *J Photochem Photobiol*. 2002. 67:157–162. doi: 10.1016/S1011-1344(02)00320-2. Ref Type: Generic.

REIJNDERS L. Nanotechnology and hazard reduction of manufactured nanoparticles. *J Cleaner Production*. 2005. Ref Type: Generic.

RHODE S., PAWLOWSKI M., TOLLRIAN R. The impact of ultraviolet radiation on the vertical distribution of zooplankton of the genus *Daphnia*. *Nature*. 2001. 412:69–72. kwell Publishing, Ltd.

ROCCO V., OPPEZZO O., PIZARRO R., SOMMARUGA R., FERRARO M. Y ZAGARESE H. Ultraviolet damage and counteracting mechanisms in the freshwater copepod *Boeckella poppei* from the Antarctic Peninsula. *Limnology and Oceanography*. 2002. 47: 829-836.

SEDA B., KE P., MOUNT A., KLAIN S. Toxicity of aqueous C<sub>70</sub>-gallic acid suspension in *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem.* 2012. 31: 215-220.

SENGUPTA, P., GOSWAMI, H., & CHANDRA, A. K. Environmental threat to male fertility by hard water metals: How protective are the citrus foods. In 100th Indian Science Congress. 2013. pp. 201-202.

SINHA R. & HÄDER D. UV-induced DNA damage and repair: A review, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002. 1, 225–236.

SOCOOWSKI R., LONGARAY M., MARTINS A., ARTIGAS J., BRANT M., MONSERRAT J., RIBAS J. Effects of carbon nanomaterials fullerene C<sub>60</sub> and fullerol C<sub>60</sub>(OH)<sub>18-22</sub> on gills of fish *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) exposed to ultraviolet radiation. *Aquat Toxicol.* 2012. 114-115:80-87.

SOMMARUGA R. Y GARCÍA-PICHEL F. UV-absorbing mycosporine-like compounds in planktonic and benthic organisms from a high-mountain lake. *Archiv für Hydrobiologie.* 1999. 144: 255-269.

TADA M., KOHNO M., NIWANO Y. Scavenging or quenching effect of melanin on superoxide anion and singlet oxygen. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2010. 46:224-228.

TAO, X., HE, Y., FORTNER, J. D., CHEN, Y., & HUGHES, J. B. Effects of aqueous stable fullerene nanocrystal (nC<sub>60</sub>) on copper (trace necessary nutrient metal): Enhanced toxicity and accumulation of copper in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 2013. 92(9), 1245-1252.

TOLLRIAN R., HEIBL C. Phenotypic plasticity in pigmentation in *Daphnia* induced by UV radiation and fish kairomones. *Funct Ecol* 2004. 18:497–502.

TOMINAGA H., KOBAYASHI Y., GOTO T., KASEMURA K., NOMURA M. DPPH radical scavenging effect of several phenylpropanoid compounds and their glycoside derivatives. *Yakugaku Zasshi.* 2005. 125:371-375.

UNTERSTEINER H., KAHAPKA J. & KAISER H. Behavioural response of the cladoceran *Daphnia magna* Straus to sublethal Copper stress—validation by image analysis *Aquatic Toxicology*. 2003. 65(4): 435-442.

USEPA, Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to fresh organisms. 2007. Washington, D C.

VOGELSON C. 2001. Advances in drug delivery systems. *Mod. Drug Discov.* 4, 49–50.

WILLIAMSON C, ZAGARESE H, SCHULTZE P, HARGREAVES B, SEVA J. The impact of short-term exposure to UV-B radiation on zooplankton communities in north temperate lakes. *J Plank Res.* 1994. 16:205–218.

WILLIAMSON, C., OLSON O., LOTT S., WALKER N., ENGSTROM D. AND HARGREAVES B. Ultraviolet radiation and zooplankton community structure following deglaciation in Glacier Bay, Alaska. *Ecology*. 2001. 82:1748–1760.

WINNER, R. & FARRELL M. Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*. *J. Fish. Res. Board Can.* 1976. 33: 1685-1691.

WISSING S., MULLER R. Solid lipid nanoparticles (SLN) – a novel carrier for UV blockers. *Pharmazie*. 2001. 56:783–786.

XING, B. S. Environmental Processes and Biototoxicity of Engineered Nanoparticles. In *Functions of Natural Organic Matter in Changing Environment*. 2013. Springer Netherlands. pp. 729-73.

ZAGARESE H, WILLIAMSON C, MISLIVETS M, ORR P. The vulnerability of *Daphnia* to UV-B radiation in the Northeastern United States. *Ergeb Limnol.* 1994. 43:207–216.

ZAGARESE H. Efecto de la radiación ultravioleta sobre los ecosistemas acuáticos. *Ciencia Hoy*. 1998. 8: 22 – 29.

ZAGARESE H. Y WILLIAMSON C. Modelin the impacts of UV-B radiation on ecological interactions in freshwater and marine ecosystems. *Stratospheric Ozone Depletion/ UV-B Radiation in the Biosphere*. 1994. Eds. Biggs R. y Joyner M. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, Germany. PP. 315-328,

ZAR J. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall. 2010. New Jersey, NY, USA.

ZEPP R., ERICKSON III D., PAUL N. AND SULZBERGER B. Interactive effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, 6, DOI: 10.1039/b700021a.

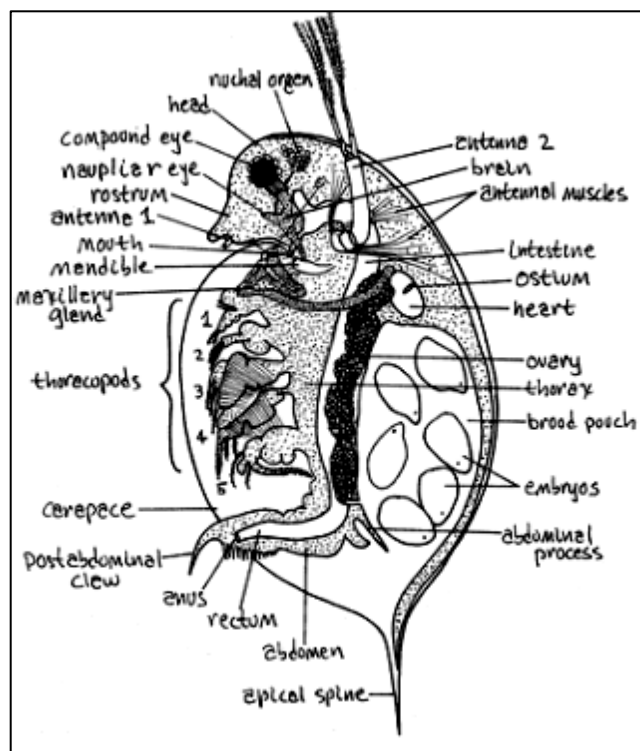
ZHOU, Z., LENK, R. P., DELLINGER, A., WILSON, S. R., SADLER, R., & KEPLEY, C. L. Liposomal formulation of amphiphilic fullerene antioxidants. *Bioconjugate chemistry*. 2010. 21(9), 1656-1661.

ZHU S, OBERDORSTER E, HAASCH M. Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C<sub>60</sub>) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow. *Mar Environ Res*. 2006. 62:S5-S9.

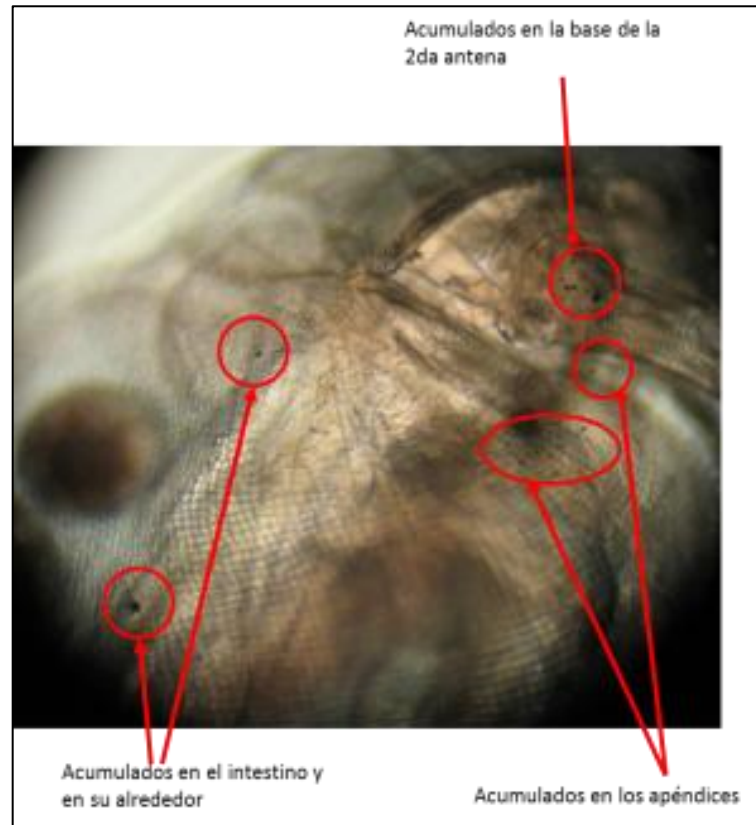
## ANEXOS

### ANEXO Nº 1: GALERÍA FOTOGRÁFICA.

Ilustración Nº 3: Partes de *Daphnia magna*.



**Ilustración N° 4:** Presencia de cúmulos de Fullereno  $C_{60}$  en *Daphnia magna*.



**Ilustración N° 5:** Prueba de Elisa para determinar Capacidad Antioxidante del  
Fulereo C<sub>60</sub> en *Daphnia magna*.

